



ANNEE 2006

THESE : 2006 – TOUT 3 – 4059

# PERFECTIONNEMENT DE LA MÉTHODE DE DÉTECTION DE LA FUMONISINE B1 DANS LE PLASMA CHEZ LE CANARD

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Lionel, Benoît, Joachim MATHEZ**

Né, le 10 octobre 1980 à CHATENAY-MALABRY (Hauts-de-Seine)

---

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Philippe GUERRE

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Gérard CAMPISTRON**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. Philippe GUERRE**  
**M. Jean-Denis BAILLY**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :  
**M. Didier TARDIEU**

Docteur de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE



## REMERCIEMENTS

A notre président de thèse,

**Monsieur le Professeur Gérard CAMPISTRON**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Physiologie – Hématologie*

Qui nous fait l'honneur de présider notre jury de thèse

Hommage respectueux

A notre jury de thèse,

**Monsieur le Professeur Philippe GUERRE**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pharmacie et toxicologie*

Qui nous a guidé dans l'élaboration de ce travail

En hommage à sa disponibilité, ses conseils et son efficacité

**Monsieur le Docteur Jean-Denis BAILLY**

Maître de Conférences de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

*Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse

Sincères remerciements

**Monsieur le Docteur Didier TARDIEU**

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse

Sincères remerciements

A Philippe Guerre,  
pour m'avoir confié ce travail et pour m'avoir encadré aussi efficacement

A Didier, Trung et Lydie,  
pour leur aide inconditionnelle et leur sympathie

A mes parents Guy et Monique parce que je leur dois tout,

A Julien, mon frère préféré,

A Laure,

Au mouss'Douze, qui sera toujours sur le pont pour moi s'il le faut,

Aux Caussade

Aux Toufous, ma seconde famille,

A Baz, Romain, Bob, Camille, Iban, Hutch, Alex, Kiki, Adros, Hélène, Michèle et la promo Labourel.

A Choquotte et Pétoche et la promo Brard.

A Philou, Bubble, Charles, Doudou, Cochon, Minou et la promo Gouffé.

A tous ceux dont j'apprécie la compagnie.

# TABLE DES MATIERES

|   |           |
|---|-----------|
| <b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>I. INTRODUCTION.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>II. MATERIEL ET METHODES.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>1. MATERIEL.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2. REACTIFS.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>3. ANIMAUX.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>4. DOSAGE DE LA FB1.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>4.1. Extraction et purification à partir du plasma.....</b>  | <b>15</b> |
| 4.1.1. Extraction sans délipidation au chloroforme.....   | 16        |
| 4.1.2. Extraction avec délipidation préalable au chloroforme.....   | 17        |
| 4.1.3. Extraction avec solubilisation des fumonisines dans la phase<br>chloroformique.....  | 19        |
| 4.1.4. Extraction avec passage sur colonnes échangeuses d'ions.....   | 21        |
| 4.1.5. Extraction avec passage sur colonnes d'immuno-affinité.....  | 22        |
| <b>4.2. Détection et quantification.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>III. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>1. OPTIMISATION DE LA METHODE DE DOSAGE.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>1.1. Optimisation de la dérivation.....</b>  | <b>26</b> |
| 1.1.1. Sélection de la meilleure méthode de dérivation.....   | 26        |
| 1.1.2. Validation de la méthode de dérivation.....  | 28        |
| <b>1.2. Optimisation de l'extraction – purification.....</b>  | <b>32</b> |
| 1.2.1. Résultats obtenus avec des plasmas non supplémentés.....   | 33        |
| 1.2.2. Résultats obtenus avec des plasmas supplémentés en FB1.....  | 34        |
| 1.2.3. Comparaison des méthodes « Témoin » et « SAX ».....  | 35        |
| <b>2. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>2.1. Calcul du coefficient d'extraction (CE).....</b>  | <b>36</b> |
| <b>2.2. Variation des teneurs en fumonisine B1 dans le plasma suite à<br/>                différentes administrations orales.....</b> | <b>37</b> |
| 2.2.1. Limites de détection.....  | 42        |
| 2.2.2. Analyse statistique des résultats obtenus.....   | 43        |
| <b>2.3. Utilisation des colonnes d'immuno-affinité.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>   | <b>48</b> |

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## LISTE DES FIGURES :

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURE 1 :</b> COMPARAISON DES STRUCTURES DE LA SPHINGOSINE ET DES FUMONISINES.....   | 7  |
| <b>FIGURE 2 :</b> DESCRIPTION DE LA METHODE D'EXTRACTION – PURIFICATION « <i>TEMOIN</i> ».....   | 16 |
| <b>FIGURE 3 :</b> DESCRIPTION DES METHODES D'EXTRACTION – PURIFICATION<br>« <i>CHLOROFORME NEUTRE</i> », « <i>CHLOROFORME HCL</i> », « <i>CHLOROFORME TCA</i> » ET<br>« <i>CHLOROFORME NaOH</i> »..... | 18 |
| <b>FIGURE 4 :</b> DESCRIPTION DE LA METHODE D'EXTRACTION - PURIFICATION « <i>CHLOROFORME<br/>ACIDIFICATION DOUCE</i> ».....  | 19 |
| <b>FIGURE 5 :</b> DESCRIPTION DE LA METHODE D'EXTRACTION – PURIFICATION « <i>PHASE<br/>CHLOROFORMIQUE</i> ».....   | 20 |
| <b>FIGURE 6 :</b> DESCRIPTION DE LA METHODE D'EXTRACTION - PURIFICATION « <i>SAX</i> ».....  | 22 |
| <b>FIGURE 7 :</b> DESCRIPTION DE LA METHODE D'EXTRACTION - PURIFICATION « <i>IA</i> ».....   | 23 |
| <b>FIGURE 8 :</b> REACTION DE DERIVATISATION PAR L'OPA.....  | 24 |
| <b>FIGURE 9 :</b> DESCRIPTION DES METHODES DE DERIVATISATION UTILISEES.....  | 25 |
| <b>FIGURE 10 :</b> REPRESENTATION DE LA LINEARITE DE LA METHODE DE DERIVATISATION.....   | 29 |
| <b>FIGURE 11 :</b> REPARTITION DES VALEURS DE CONCENTRATION OBTENUES PAR LES METHODES<br>« <i>STANDARD DU JOUR</i> » (A) ET « <i>GAMME</i> » (B).....  | 41 |
| <b>FIGURE 12 :</b> DISTRIBUTION DES INTERFERENCES LORS DU CALCUL PAR LES METHODES<br>"STANDARD DU JOUR" (A) ET "GAMME" (B).....  | 44 |
| <b>FIGURE 13 :</b> REPARTITION DES VALEURS DE SURFACE OBTENUES PAR L'UTILISATION DE<br>COLONNES D'IMMUNO-AFFINITE.....   | 45 |

## LISTE DES TABLEAUX :

|  |    |
|--|----|
| <b>TABLEAU 1 :</b> DOSES DE FB1 ADMINISTREES PAR VOIE ORALE AUX CANARDS.....   | 14 |
| <b>TABLEAU 2 :</b> COMPARAISON DES DIFFERENTES METHODES DE DERIVATISATION.....   | 27 |
| <b>TABLEAU 3 :</b> ETUDE DE LA LINEARITE DE LA METHODE DE DERIVATISATION SELECTIONNEE ...  | 28 |
| <b>TABLEAU 4 :</b> REPETABILITE DE LA METHODE DE DOSAGE.....   | 30 |
| <b>TABLEAU 5 :</b> REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE DE DOSAGE.....   | 31 |
| <b>TABLEAU 6 :</b> COMPARAISON DES METHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION LORS<br>D'UTILISATION DE PLASMAS NON SUPPLEMENTES.....                               | 33 |
| <b>TABLEAU 7 :</b> COMPARAISON DES METHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION LORS<br>D'UTILISATION DE PLASMAS SUPPLEMENTES EN FB1.....                            | 34 |
| <b>TABLEAU 8 :</b> COMPARAISON DES METHODES « <i>TEMOIN</i> » ET « <i>SAX</i> ».....   | 35 |
| <b>TABLEAU 9 :</b> CALCUL DU COEFFICIENT D'EXTRACTION DE LA METHODE D'EXTRACTION PAR<br>PASSAGE SUR COLONNE ECHANGEUSE D'IONS.....                               | 37 |
| <b>TABLEAU 10 :</b> RESULTATS DU DOSAGE DES ECHANTILLONS DE PLASMA , OBTENUS PAR LA<br>METHODE « <i>STANDARD DU JOUR</i> ».....                                  | 39 |
| <b>TABLEAU 11 :</b> RESULTATS DU DOSAGE DES ECHANTILLONS DE PLASMA, OBTENUS PAR LA<br>METHODE « <i>GAMME</i> ».....  | 40 |
| <b>TABLEAU 12 :</b> VALEURS DES PERCENTILES DES INTERFERENCES.....   | 44 |
| <b>TABLEAU 13 :</b> SURFACES DES CHROMATOGRAPHES OBTENUES APRES PURIFICATION DE PLASMA<br>PAR COLONNES D'IMMUNO-AFFINITE ET PAR COLONNES ECHANGEUSES D'IONS..... | 46 |

## I. INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des toxines issues du métabolisme secondaire de diverses moisissures. Ces moisissures se développent sur les denrées alimentaires et notamment les céréales lors de leur culture, de leur récolte ou de leur stockage, dans certaines conditions environnementales [1, 2, 3, 4]. De récentes études ont révélé que 25% des grains produits chaque année dans le monde sont contaminés par des mycotoxines [1].

Les fumonisines sont des mycotoxines isolées pour la première fois en 1988 [5] et synthétisées essentiellement par les moisissures du genre *Fusarium* et particulièrement par l'espèce *Fusarium verticillioides* [6]. Ces mycotoxines sont retrouvées principalement dans le maïs [7] et sont isolées partout dans le monde [8]. En Europe, sur 256 échantillons de maïs analysés, 199 contenaient des fumonisines, à des concentrations comprises entre 0,01 et 250mg/kg [9]. De même, une étude réalisée dans le sud ouest de la France a permis d'isoler 73 souches de *F. verticillioides* et toutes produisaient de la fumonisine à des taux très variables [4].

La fumonisine la plus abondante et la plus toxique est la Fumonisine B1 (FB1). Elle présente une analogie structurale avec la sphingosine ce qui lui confère une action d'inhibition compétitrice vis-à-vis d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des sphingolipides, comme la N-acétyl transférase [10, 11, 12, 13]. La conséquence est l'accumulation de bases sphingoides libres et la diminution de production de céramides. Ces derniers sont des phospholipides aux propriétés structurales et fonctionnelles. Ils participent en effet à la transcription de certains gènes et à la modulation de l'activation de certaines protéines cellulaires. De ce fait, des fonctions biologiques telles que la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire ou l'apoptose sont altérées par l'action de la fumonisine B1, ce qui explique ses propriétés cytotoxiques et son pouvoir carcinogène [14, 15, 16, 17, 18].

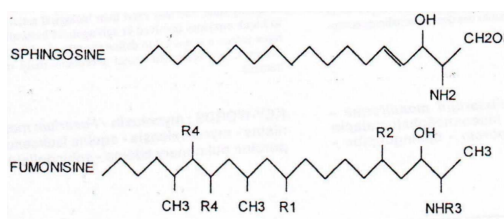


Figure 1: Comparaison des structures de la sphingosine et des fumonisines

Les mycotoxicoses induites par la FB1 présentent des symptomatologies à forte variabilité interspécifique [19, 20, 21]. Le cheval et le porc sont les deux espèces les plus sensibles [19]. Chez le cheval, l'intoxication provoque une leucoencéphalomalacie, expliquée par une faible teneur en sphingomyélines des membranes cellulaires du système nerveux central [22]. Chez le porc, la mycotoxicose se manifeste par la présence d'œdèmes pulmonaires qui pourraient s'expliquer par une augmentation de la perméabilité membranaire des cellules endothéliales pulmonaires due à une accumulation de sphinganine libre dans ces cellules [19]. D'autres signes de toxicité sont rapportés et ce pour de nombreuses espèces animales : des signes de toxicité rénale sont observés chez le cheval, le porc, le rat et l'ovine, et des signes de toxicité hépatique sont rapportés chez toutes les espèces étudiées. Les espèces polygastriques sont moins sensibles et seules de fortes doses administrées sont à l'origine de signes cliniques, principalement digestifs ou rénaux [19]. Les volailles sont également peu sensibles. Le poulet présente des troubles de l'hémostase, une altération des protéines sériques et une diminution de la concentration des lipides hépatiques [23, 24]. Le canard présente principalement une atteinte hépatique et un retard de croissance [25].

Les fumonisines semblent également présenter un danger pour l'homme. Une corrélation positive a été mise en évidence entre le taux de cancer de l'œsophage et la consommation excessive de produits contaminés par ces composés, en Afrique du sud, en Italie, aux USA, en Chine ou en Iran [8].

Ces études ont amené l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) à classer les fumonisines dans la classe 2B c'est-à-dire celle des molécules potentiellement cancérogènes pour l'homme et cancérogènes pour les animaux [26]. Il n'existe actuellement en Europe pas de dispositions réglementant les teneurs en fumonisines dans les produits alimentaires sauf en Suisse où un niveau de contamination maximum toléré en fumonisine dans le maïs pour la consommation humaine est appliqué (concentration en FB1+ FB2  $\leq 1000 \mu\text{g/kg}$ ) [27]. Mais s'il n'y a pas de normes réglementaires en vigueur dans d'autres pays, il existe des recommandations multiples. Le conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) a proposé pour les céréales une limite de 3 mg/kg qui permet l'élimination des lots les plus contaminés. Les recommandations de la Commission



Européenne proposent un taux maximal de 2 mg/kg de fumonisine B1 et B2 dans le maïs brut. Le JEFCA (Joint FAO-OMS Expert Committee on Food Additives) a proposé une dose journalière maximum tolérable de 2 µg/kg par jour pour les fumonisines B1, B2 et B3 seule ou en combinaison [28]. La Food and Drugs administration a proposé un taux maximal de fumonisine de 2 à 4 mg/g dans l'alimentation humaine et de 5 à 100 mg/kg dans l'alimentation animale [29].

La mise en place de normes pour les fumonisines est de ce fait une préoccupation majeure de comités scientifiques qui évaluent depuis plusieurs années la toxicité des fumonisines.

Les méthodes d'analyses de ces molécules font donc l'objet de nombreuses études. De nombreuses méthodes de dosage sont validées pour la recherche de fumonisine dans les matrices végétales. Ces méthodes varient en fonction de leurs procédés d'extraction, de purification et de quantification. Les qualités de ces techniques sont variables et leurs limites de détection le sont également [27, 30].

Peu d'études sur le dosage des fumonisines contenues dans les matrices carnées ont été menées à l'heure actuelle. Ces méthodes de dosages sont mises au point à partir des méthodes utilisées et validées sur matrice végétale [31, 32].

Notre étude a pour objectif de déterminer la dose minimale de fumonisine B1 détectable dans le plasma de canards après administration orale de quantités variables. Pour cela, nous sélectionnerons dans un premier temps la méthode analytique la plus adaptée à nos travaux : plusieurs méthodes de dérivation seront comparées de même que plusieurs méthodes d'extraction et de purification des plasmas ; la méthode analytique la plus sensible ainsi sélectionnée sera appliquée aux plasmas de canards.

## **II. MATERIEL ET METHODES.**

### **1. Matériel.**

Les consommables utilisés consistent en des tubes à hémolyse Dispens-A-Pak Borex, des micropipettes et des cônes P10 P100 et P1000 Eppendorf (Hambourg, Allemagne), des tubes Eppendorf de 2 ml, des tubes en plastique de 15 ml Falcon (Elancourt, France), des seringues de 1ml Codan ( Allemagne), des aiguilles Néolus 0,6 mm Terumo (Belgique), des filtres à seringue de 4 mm avec une membrane de 0,45 µm Gelmon Laboratory (USA), des tubes EDTA de 3 ml VT-030STK Venoject (Leuven, Belgique).

Les colonnes d'extraction utilisées sont de deux types : colonnes échangeuses d'ions SAX 500 mg Bond Elut (Harbor City, USA) et des colonnes d'immuno-affinité Fumoniprep de R-Biopharm (France).

Tous les réactifs chimiques ont été pesés grâce à une balance de précision AJ 100 Mettler (Viroflay, France) hormis ceux utilisés pour la préparation des solutions tampons, pesés sur une balance Sartorius BP 2100 (Toledo, Espagne).

Le pH-mètre 522 utilisé vient de Technalab (Toulouse, France) et l'agitateur magnétique Rotomag 10 vient de Prolabo (France).

Un vortex VF2 et une table d'agitation horizontale IKA Labortechnik (Staufen, Allemagne) sont utilisés pour l'agitation des échantillons.

Une pompe à vide et à air DAA-124-ED de MFG corp. (USA) est utilisée pour filtrer le solvant d'élution du système HPLC, pour l'évaporation à sec sous courant d'azote et pour l'extraction lors de l'utilisation de colonnes d'extraction.

Une fiole à vide de 1L Millipore (Allemagne) et des filtres nylon 0,2 µm Sun-sri (USA) ont été utilisés pour filtrer le solvant d'élution du système HPLC.

Une centrifugeuse GP 200 SX Jouan (France) est utilisée pour la centrifugation des échantillons.

L'évaporation a lieu sous hotte de classe B NFX 15211 Astec (Alfortville, France) avec un courant d'azote.

Un module d'extraction sous vide Visprep 12 ports Supelco (USA) est utilisé en association avec les colonnes d'extraction.

Le système HPLC est composé d'une pompe M 2200 (Bischoff, Leonberg, Allemagne) reliée à une colonne prontosil C<sub>18</sub> (porosité 5µm, taille 250x4,6mm) (Bischoff chromatography, Leonberg, Allemagne). La pré-colonne placée en tête de colonne est de même nature que la colonne et provient du même fournisseur. L'injection de l'extrait dérivatisé se fait avec une seringue en verre de 100 µl (Kloehn, Las Vegas, USA). La sortie de colonne est connectée au détecteur de fluorescence programmable RF 10A XL (Shimadzu, Kyoto, Japon) ainsi qu'à un système d'acquisition de données pic3 (ICS, Toulouse, France). La longueur d'onde d'excitation est de 335 nm et la longueur d'onde émise de 400 nm. Le débit du solvant d'élution est constant, 1ml/minute.

## 2. Réactifs.

Le dihydrogénophosphate de sodium (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), l'acide orthophosphorique 85% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) sont fournis par Fluka (Buchs, Allemagne).

L'acide chlorhydrique fumant (HCl) et l'hydroxyde de sodium (NaOH) sont fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne).

L'acide acétique glacial qualité HPLC (CH<sub>3</sub>COOH), l'acétonitrile qualité HPLC (CH<sub>3</sub>CN), l'eau qualité HPLC (H<sub>2</sub>O), le méthanol (CH<sub>3</sub>OH), l'acide trichloroacétique (CCl<sub>3</sub>COOH) et le chlorure de sodium (NaCl) sont fournis par Scharlau (Barcelone, Espagne).

Le tétraborate de sodium (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>), l'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), l'o-phthaldialdéhyde (OPA) qualité HPLC (C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) le β2-mercaptoéthanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) et le standard Fumonisine B1 CAS N° 116355-83-0 (C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>) sont fournis par Sigma (M.O, USA).

La Fumonisine B1 utilisée pour l'administration aux animaux a été produite et purifiée à l'ENVT par l'équipe de mycologie [33].

Deux solutions tampon borates sont préparées pour la préparation des échantillons :

- pH 8,5 : 45 ml d'acide borique 1M et 5 ml de borate de sodium 0,1M. Cette solution tampon est utilisée lors de la réaction de dérivation : 8,5 est en effet la valeur du pH optimal de la réaction de dérivation de la FB1 par l'OPA.

- pH 5,8 : 100 ml d'acide borique 0,1M ajusté par la solution de borate de sodium 0,1M. Cette solution tampon est utilisée lors de l'étape d'extraction de la FB1. Le pH de ces solutions est vérifié au moyen du pH mètre du laboratoire.

Un tampon phosphate salin (PBS) est également utilisé. Cette solution tampon est utilisée dans le procédé d'extraction et de purification des échantillons utilisant des colonnes d'immuno-affinité.

Deux réactifs de dérivation différents sont utilisés.

La première solution d'OPA, dite solution d'*OPA AFNOR*, est préparée selon la norme AFNOR NF EN 13585 : 40 mg OPA sont dilués dans 1 ml de méthanol puis dans mélange à 5 ml de tétraborate de sodium. 50 µl de 2-βmercaptoethanol (2βME) sont ajoutés au mélange obtenu.

La seconde solution d'OPA, dite solution d'*OPA Diluée*, est préparée de la manière suivante : 20 mg d'OPA sont dilués dans 10ml d'acétonitrile. 20 µl de 2βME sont ajoutés.

Le solvant d'élution pour le système HPLC est préparé conformément aux recommandations AFNOR pour le dosage de fumonisine sur matrice végétale : 23 volumes d'une solution de sodium dihydrogène phosphate 0,1M sont mélangés à 77 volumes de méthanol. Le pH est ensuite ajusté avec l'acide orthophosphorique pour obtenir un pH de 3,35 ou à 1,5. Ce solvant est ensuite filtré sous vide.

### **3. Animaux.**

25 canards mulards mâles (croisement entre un mâle de barbarie (*Cairina moschata*) et une cane dite « commune » (*Anas platyrhynchos*) ont été utilisés. Ils

pèsent environ 250 g chacun et proviennent de la société Pyrénées Gascogne Aviculture (l'Isle-Jourdain, France).

Les solutions de gavage ont été préparées avec de la fumonisine B1 produite et purifiée à l'ENVT par l'équipe de mycologie. La solution de Fumonisine B1 originale a été dosée plusieurs fois à 6 mg/ml.

Différentes solutions ont été préparées à partir de cette solution primaire. Des solutions dont les concentrations en FB1 sont comprises entre 15 µg/ml et 4 mg/ml ont ainsi été obtenues. Les canards sont mis à jeun depuis un minimum de 8h. Chaque canard a été pesé juste avant l'administration par voie orale de fumonisine. 10ml/kg de poids vif sont administrés aux animaux hormis les deux derniers canards de l'étude qui ont reçu la quantité de solution de FB1 à 6 mg/ml nécessaire pour obtenir une quantité de FB1 administrée égale à 80 mg/kg de poids vif, soit 13 ml/kg de poids vif. Cinq canards témoins n'ont pas reçu de FB1 mais de l'eau distillée.

Le tableau n°1 présente les doses de FB1 administrées oralement aux canards.

Les animaux ont été sacrifiés 90 minutes après l'administration de FB1. Des études antérieures ont en effet montré que la concentration maximale de fumonisine dans le sang après administration orale était atteinte entre 1 et 2 h [34].

Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur tubes EDTA. Les tubes de sang sont ensuite centrifugés et les plasmas sont récupérés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

| <b>N° Canard</b> | <b>Poids vif (g)</b> | <b>Solution administrée</b> | <b>Quantité administrée</b> | <b>Quantité de FB1 administrée par kg de PV</b> |
|------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| 0-1              | 250                  | Eau distillée               | 2,5 ml                      | 0   |
| 0-2              | 316                  | Eau distillée               | 3,15 ml                     | 0   |
| 0-3              | 236                  | Eau distillée               | 2,36 ml                     | 0   |
| 0-4              | 303                  | Eau distillée               | 3,03 ml                     | 0   |
| 0-5              | 273                  | Eau distillée               | 2,73 ml                     | 0   |
| 0,15-1           | 276                  | FB1: 0,015 mg/ml            | 2,75 ml                     | 0,15 mg/kg                                      |
| 0,15-2           | 259                  | FB1: 0,015 mg/ml            | 2,6 ml                      | 0,15 mg/kg                                      |
| 0,3-1            | 298                  | FB1: 0,03 mg/ml             | 3 ml                        | 0,3 mg/kg                                       |
| 0,3-2            | 215                  | FB1 : 0,03 mg/ml            | 2,15 ml                     | 0,3 mg/kg                                       |
| 0,6-1            | 274                  | FB1 : 0,06 mg/ml            | 2,75 ml                     | 0,6 mg/kg                                       |
| 0,6-2            | 264                  | FB1 : 0,06 mg/ml            | 2,65 ml                     | 0,6 mg/kg                                       |
| 1,25-1           | 262                  | FB1 : 0,125 mg/ml           | 2,60 ml                     | 1,25 mg/kg                                      |
| 1,25-2           | 216                  | FB1 : 0,125 mg/ml           | 2,15 ml                     | 1,25 mg/kg                                      |
| 2,5-1            | 256                  | FB1 : 0,25 mg/ml            | 2,55 ml                     | 2,5 mg/kg                                       |
| 2,5-2            | 294                  | FB1 : 0,25 mg/ml            | 2,95 ml                     | 2,5 mg/kg                                       |
| 5-1              | 222                  | FB1 : 0,5 mg/ml             | 2,20 ml                     | 5 mg/kg   |
| 5-2              | 183                  | FB1 : 0,5 mg/ml             | 1,85 ml                     | 5 mg/kg   |
| 10-1             | 264                  | FB1 : 1 mg/ml               | 2,65 ml                     | 10 mg/kg  |
| 10-2             | 252                  | FB1 : 1 mg/ml               | 2,50 ml                     | 10 mg/kg  |
| 20-1             | 226                  | FB1 : 2 mg/ml               | 2,25 ml                     | 20 mg/kg  |
| 20-2             | 250                  | FB1 : 2 mg/ml               | 2,5 ml                      | 20 mg/kg  |
| 40-1             | 275                  | FB1 : 4 mg/ml               | 2,75 ml                     | 40 mg/kg  |
| 40-2             | 306                  | FB1 : 4 mg/ml               | 3,05 ml                     | 40 mg/kg  |
| 80-1             | 216                  | FB1 : 6 mg/ml               | 2,85 ml                     | 80 mg/kg  |
| 80-2             | 230                  | FB1 : 6 mg/ml               | 3,00 ml                     | 80 mg/kg  |

**Tableau 1 : Doses de FB1 administrées par voie orale aux canards**

## **4. Dosage de la FB1.**

### **4.1. Extraction et purification à partir du plasma.**

L'extraction est la première étape pour la récupération de fumonisine dans les matrices. Pour les échantillons liquides (plasma, urine ou milieu de culture liquide) seule une étape d'homogénéisation dans un solvant est nécessaire [31]. Les fumonisines sont hydrosolubles et les solvants le plus souvent utilisés sont des mélanges eau-acétonitrile (1-1) ou méthanol-eau (3-1) [8].

L'étape de purification a pour but d'éliminer les molécules de configuration proche des fumonisines et qui pourraient interférer lors du dosage. Ce sont principalement des lipides et des protides. Différents procédés ont été validés pour la purification d'échantillons provenant de matrice végétale. Les méthodes les plus utilisées nécessitent un passage sur phase solide, comme des colonnes échangeuses d'ions, des colonnes greffées C<sub>18</sub> ou des colonnes d'immuno-affinité. Pour la purification du plasma ce sont les colonnes échangeuses d'ions qui sont le plus souvent utilisées avec quelques modifications méthodologiques par rapport à leur emploi lors de la purification de matrice végétale [35]. La méthode utilisant la colonne de silice greffée [36] est beaucoup moins utilisée car elle entraîne une moins bonne séparation de la FB1. Les colonnes d'immuno-affinité sont également peu utilisées : elles donnent de très bons résultats mais elles sont plus coûteuse [37].

Les travaux présentés ci-après ont porté sur l'étude des méthodes d'extraction suivantes :

- extraction sans délipidation au chloroforme,
- extraction avec délipidation préalable au chloroforme,
- extraction avec passage sur colonnes échangeuses d'ions,
- extraction avec passage sur colonnes d'immuno-affinité.

La meilleure de ces méthodes sera sélectionnée pour purifier les plasmas de canards.

#### 4.1.1. Extraction sans délipidation au chloroforme.

500 µl de plasma sont prélevés, auxquels sont ajoutés 1ml de la solution de tampon borate de pH= 5,8 et 1,5ml d'acétonitrile. Le mélange obtenu est agité pendant 30 minutes puis centrifugé pendant 40 minutes à 4000 tours par minute (rpm). Le surnageant est récupéré et évaporé à sec sous azote à une température comprise entre 55°C et 65°C. Le résidu sec est récupéré dans 500 µl de mélange eau et acétonitrile de proportion 1-1 puis filtré à l'aide de filtres à seringue à pores de 0,45 µm. La solution obtenue est dérivatisée et injectée au système HPLC. Cette méthode fut utilisée lors d'études précédentes au laboratoire [34, 38]. Cette méthode est appelée méthode « *Témoin* » Elle est présentée dans la figure n°2.

Une autre méthode très similaire à la précédente est testée. Elle est identique à la « méthode témoin » excepté le fait que le plasma est dilué trois fois dans de l'eau lors du mélange initial. Cette méthode est appelée méthode « *Dilution* »

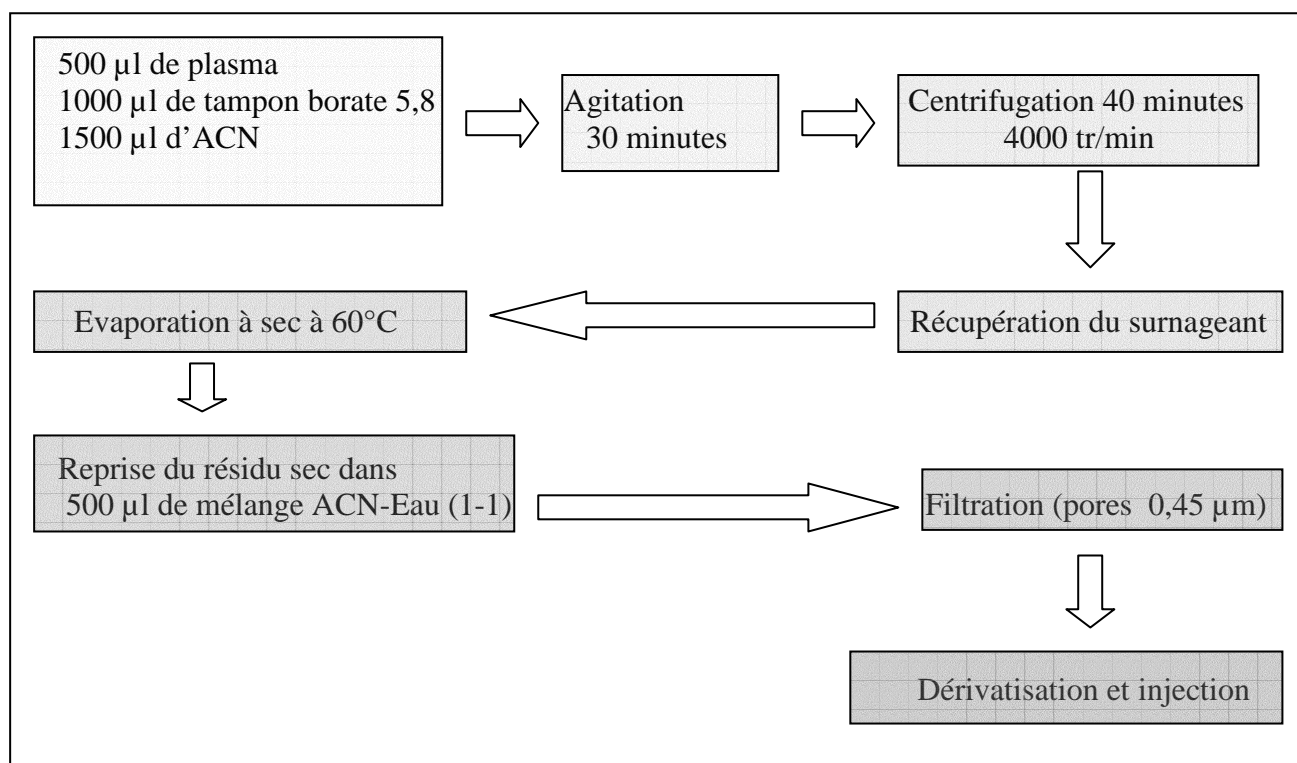


Figure 2 : Description de la méthode d'extraction – purification « *Témoin* ».



#### 4.1.2. Extraction avec délipidation préalable au chloroforme

Plusieurs méthodes utilisant une étape préalable de délipidation au chloroforme ont été testées. Cette étape a pour but de purifier l'échantillon solubilisant les lipides dans le chloroforme afin de les éliminer.

Cinq méthodes reposant sur ce principe ont été utilisées :

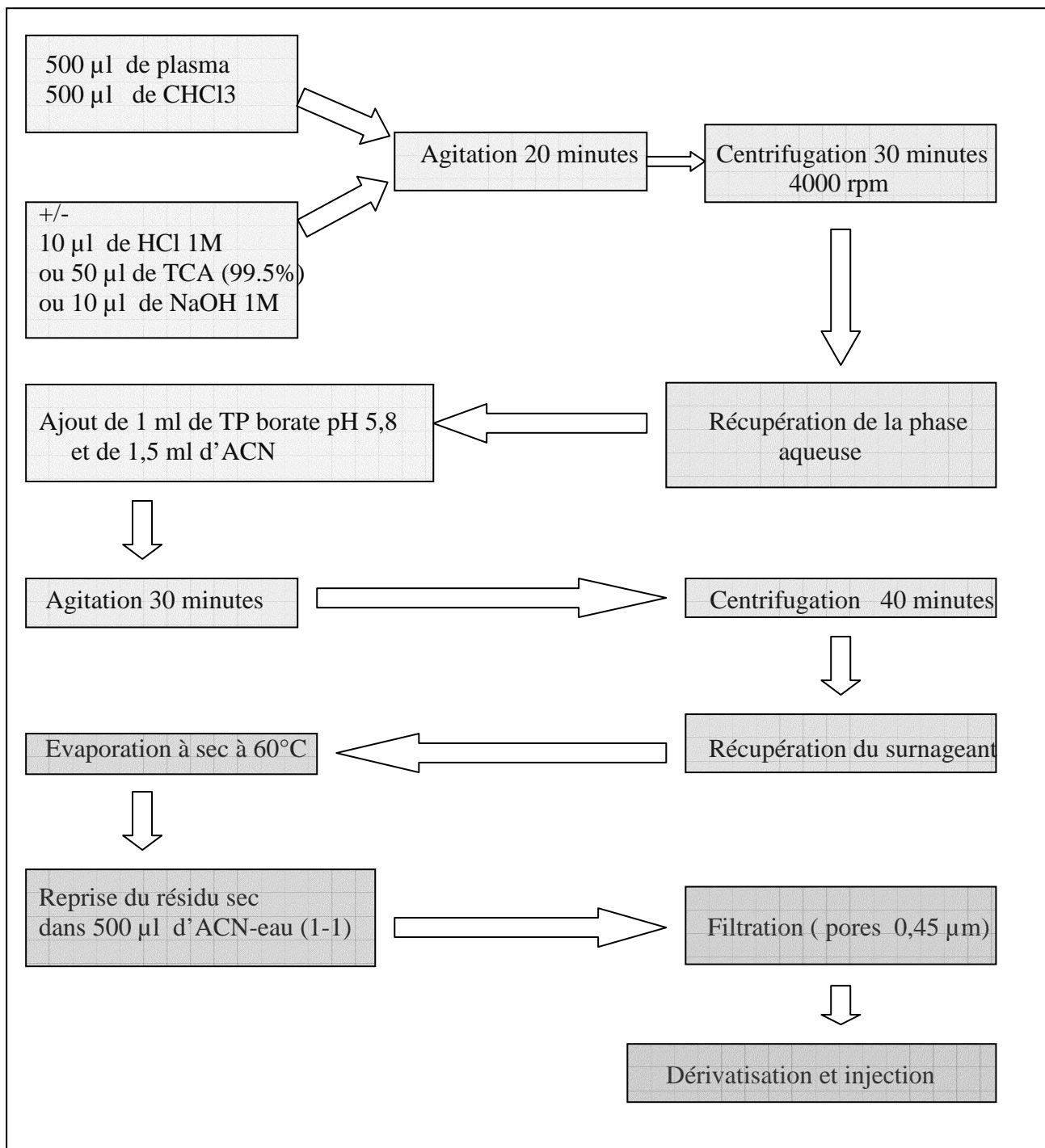
- utilisation du chloroforme seul : 500 µl de plasma sont prélevés et mélangés à 500 µl de chloroforme. Cette méthode est appelée méthode « *Chloroforme neutre* »,
- ajout de 10 µl d'acide chlorhydrique 1M au mélange initial. Cette méthode est appelée méthode « *Chloroforme HCl* »,
- ajout de 50 µl d'acide trichloracétique à 99,5% au mélange initial. Cette méthode est appelée méthode « *Chloroforme TCA* »,
- ajout de 10 µl d'hydroxyde de sodium 1M au mélange initial. Cette méthode est appelée méthode « *Chloroforme NaOH* ».

Quelle que soit la composition du mélange, il est agité pendant 20 minutes et centrifugé 30 minutes à 4000 rpm. .

Seule la phase aqueuse est récupérée et 1,5 ml d'acétonitrile et 1 ml de tampon borate de pH 5,8 y sont ajoutés. Le tout est agité pendant 30 minutes, centrifugé 40 minutes à 4000 rpm. Le surnageant est récupéré, évaporé à sec et repris dans 500 µl de mélange eau/acétonitrile de proportion 1-1. La solution obtenue est filtrée sur des filtres à seringue, dérivatisée et injectée au système HPLC.

Ces méthodes sont représentées dans la figure n°3.

La cinquième méthode repose sur le fait d'acidifier le mélange initial de manière plus douce qu'avec l'acide chlorhydrique. Elle consiste à prélever 500 µl de plasma, les mettre en présence de 1ml de tampon borate de pH 5,8 et de 500 µl de chloroforme. Ce mélange est agité 20 minutes puis centrifugé 30 minutes à 4000 rpm. La phase aqueuse est récupérée et mise en présence de 1,5 ml d'acétonitrile ; ce mélange est agité 30 minutes et centrifugé 40 minutes. Les étapes suivantes sont inchangées : récupération du surnageant, évaporation à sec, reprise dans 500 µl de mélange eau-acétonitrile 1-1, mélange puis filtration sur filtre à seringue avant dérivatisation et injection. Cette méthode, nommée méthode « *Chloroforme acidification douce* » est représentée dans la figure n°4.



**Figure 3 : Description des méthodes d'extraction – purification « Chloroforme neutre », « Chloroforme HCl », « Chloroforme TCA » et « Chloroforme NaOH ».**

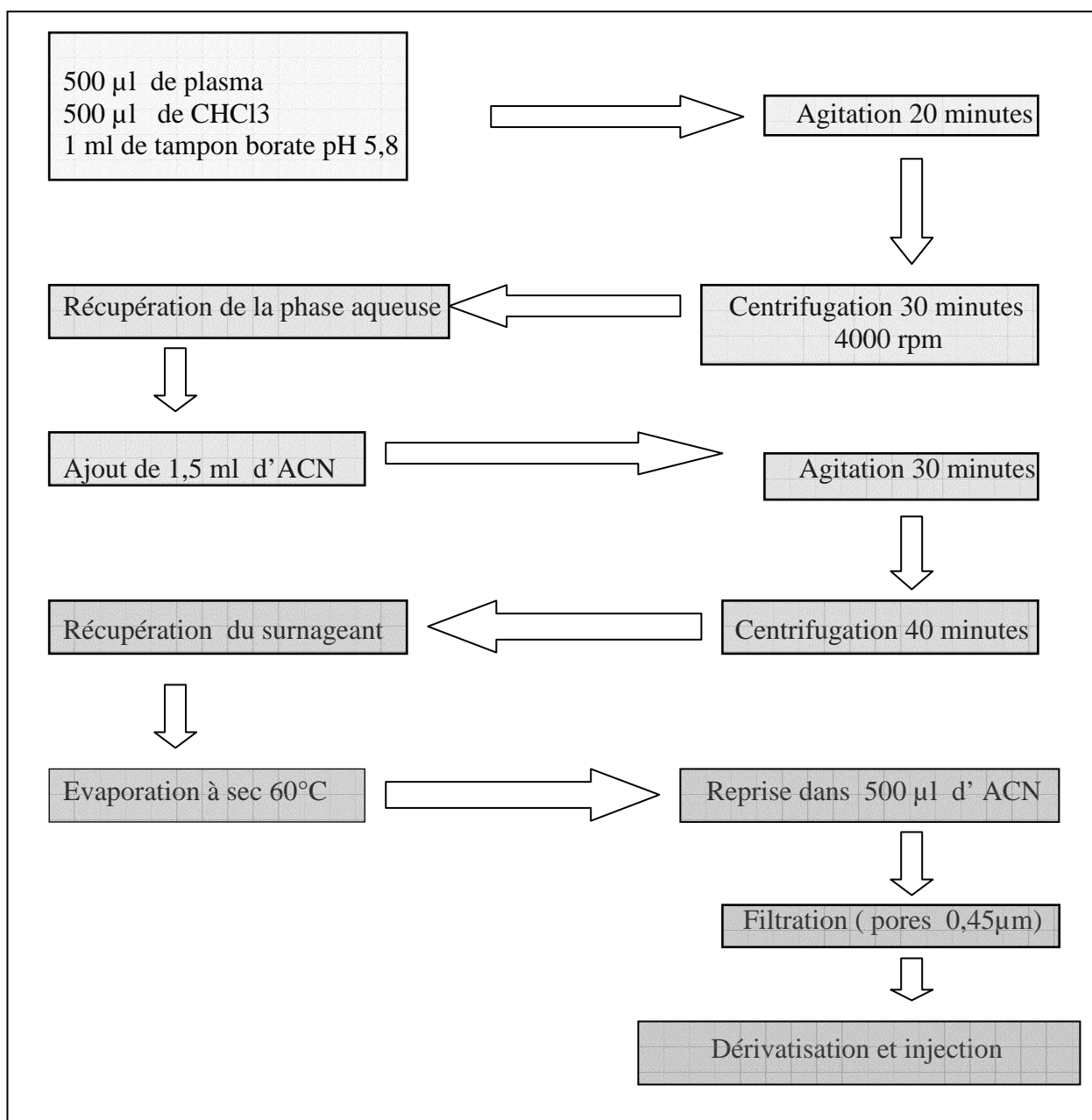


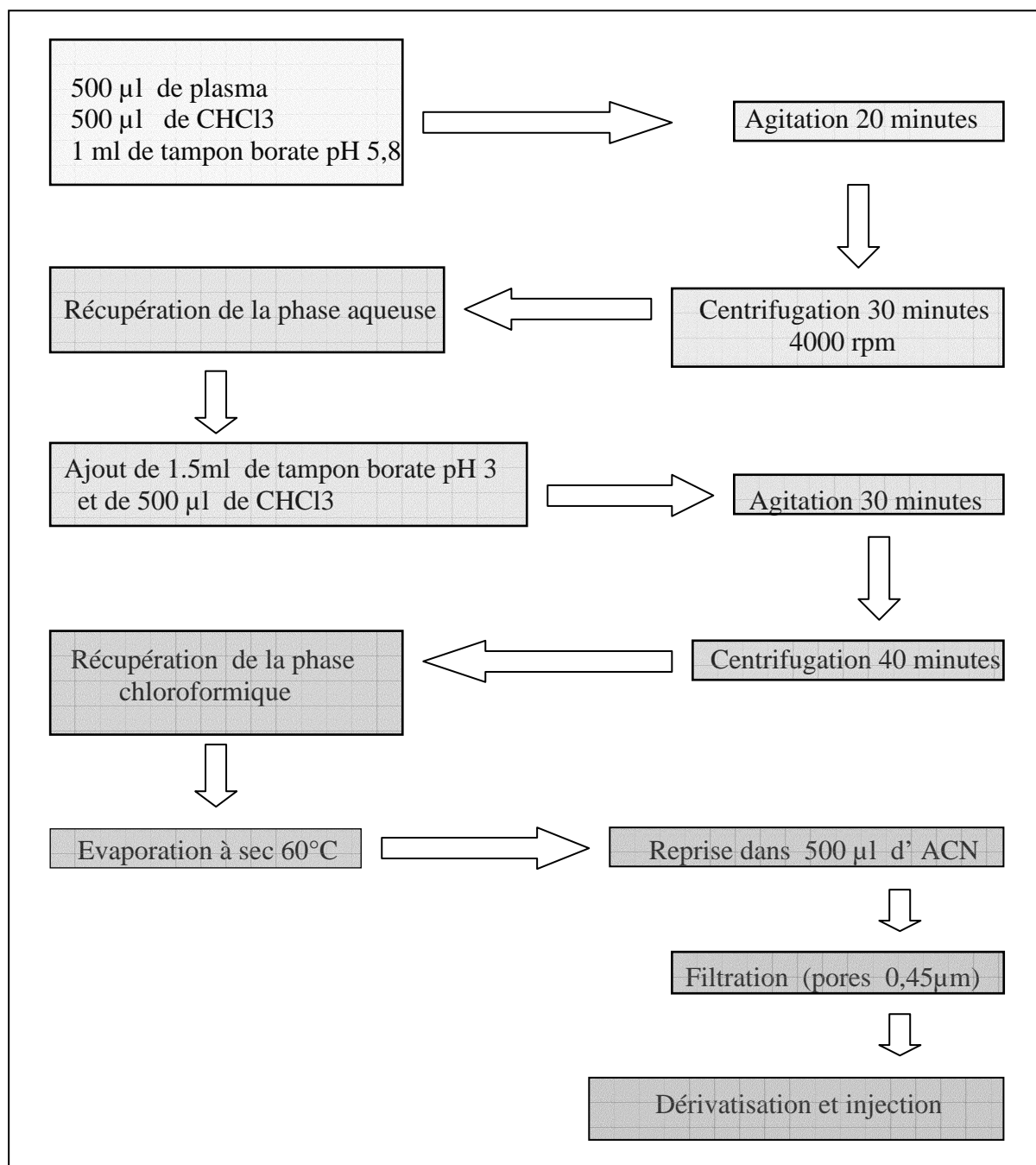
Figure 4 : Description de la méthode d'extraction - purification « *Chloroforme acidification douce* ».

#### 4.1.3. Extraction avec solubilisation des fumonisines dans la phase chloroformique.

Cette méthode consiste à acidifier de manière plus prononcée les fumonisines afin d'essayer de les récupérer dans la phase chloroformique. Le mélange initial et la première étape sont inchangés : 500 µl de plasma sont prélevés, mélangés à 1ml de tampon borate de pH=5,8 et 500 µl de chloroforme ; ce mélange subit une agitation pendant 20 minutes et une centrifugation pendant 30 minutes à 4000 rpm. La phase

aqueuse est récupérée et mise en présence de 1ml de tampon borate de pH 3 et de 500µl de chloroforme. Le mélange est agité 30 minutes et centrifugé 45 minutes. Puis la phase chloroformique est récupérée et évaporée a sec. La reprise s'effectue avec 500µl de mélange eau-acétonitrile 1-1 et les étapes de filtration, de dérivation et d'injection au système HPLC sont inchangées.

Cette méthode est appelée méthode « *Phase chloroformique* » et elle est présentée dans la figure n°5.



**Figure 5 : Description de la méthode d'extraction – purification « *Phase chloroformique* »**

#### 4.1.4 Extraction avec passage sur colonnes échangeuses d'ions.

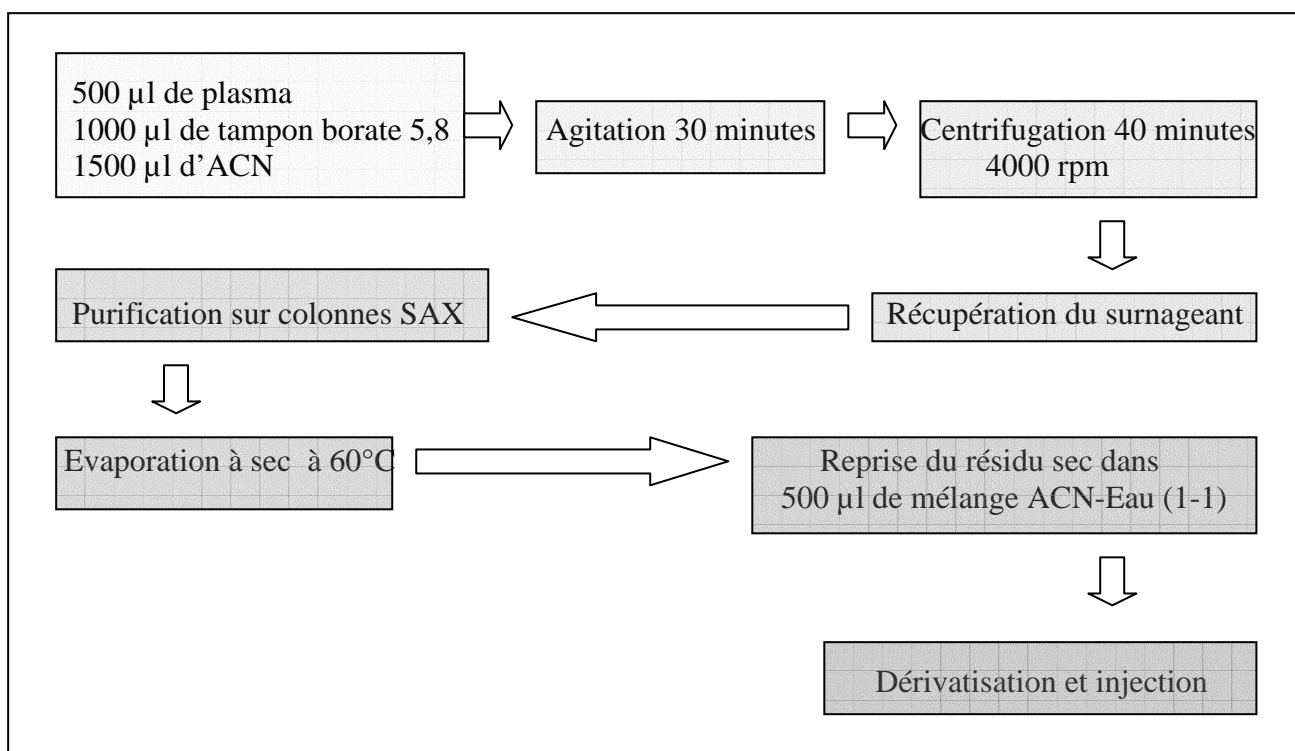
L'extraction des fumonisines par passage sur colonnes échangeuses d'ions est la méthode de purification la plus fréquemment utilisée pour la purification d'échantillons d'origine animale [31].

500 µl de sérum sont prélevés et mélangés à 1ml de tampon borate à pH=5,8 et 1,5 ml d'acétonitrile. Compte tenu du caractère acide de la FB1, le pH du soluté doit en effet être compris entre 5,8 et 6,5 afin qu'elle soit ionisée [39]. Le mélange est agité 30 minutes et centrifugé 40 minutes à 4000 rpm. Le surnageant est récupéré et purifié sur des colonnes d'extraction en phase solide (EPS) avec cartouche à résine échangeuse d'ions fortement basique SAX. Cette purification suit les recommandations AFNOR pour le passage sur colonnes d'échantillons extraits à partir de maïs : la cartouche est conditionnée par des lavages successifs avec 5ml de méthanol absolu puis 5ml d'une solution de méthanol à 75% (et 25% d'eau). Le débit d'écoulement est maintenu à un maximum de 2 ml par minutes. La totalité de l'échantillon est alors appliqué sur la colonne toujours au même débit. La cartouche est lavée avec 5 ml de solution de méthanol à 75% puis avec 3ml de méthanol absolu.

Les cartouches sont éluées avec 10ml d'une solution de mélange méthanol (99%) et acide acétique glacial (1%), à un débit maximum de 1ml par minute. Certains préconisent l'utilisation d'une solution d'acide acétique à 0,5%, mais les meilleurs résultats sont obtenus avec une solution à 1% [40]. La vitesse de progression du soluté dans la colonne n'est pas un facteur modifiant la récupération [39], cependant pour optimiser la collecte, la vitesse de passage recommandée pour l'éluant sur la colonne est 1ml/min [41].

L'éluat est repris dans 500 µl de mélange eau-acétonitrile 1-1. La solution obtenue est ensuite et injectée au système HPLC.

Cette méthode est appelée méthode « SAX ». Elle est présentée dans la figure n°6.



**Figure 6 : Description de la méthode d'extraction - purification « SAX »**

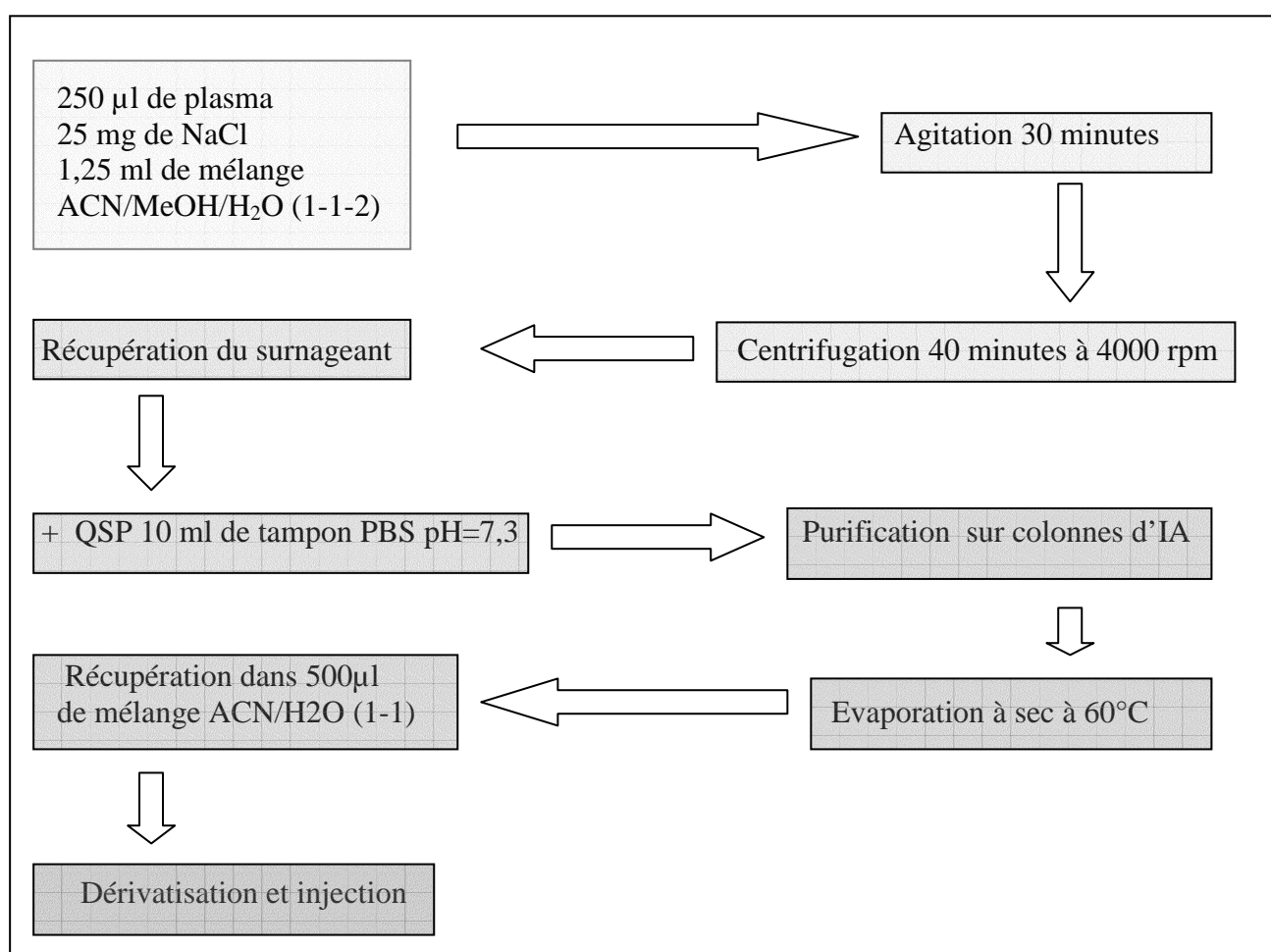
#### 4.1.5. Extraction avec passage sur colonnes d'immuno-affinité.

L'utilisation de colonnes à immuno-affinité se base sur la formation d'un complexe anticorps-antigène. Elle présente une bonne sélectivité. Les anticorps utilisés sont liés à un support de gel d'agarose, de sépharose ou de dextran. La formation du complexe anticorps-antigène fixe la fumonisine. Le rinçage élimine les composants indésirables de la matrice. L'éluant est un solvant qui permet de récupérer les fumonisines, en altérant le complexe anticorps-antigène [42,43].

250 µl de plasma sont prélevés et mis en présence de 25 mg de NaCl et de 1,250ml d'un mélange eau-acétonitrile-méthanol en proportions respectives 50/25/25. Le mélange est agité 30 minutes et centrifugé 40 minutes. Le surnageant est récupéré et 10 ml de tampon phosphate salin (PBS) y sont ajoutés.

La solution est passée sur les colonnes d'immuno-affinité au rythme d'écoulement de 1 à 2 gouttes par secondes. La colonne est lavée avec 10 ml de tampon PBS (rythme d'écoulement inchangé). L'élution s'effectue avec 1,5 ml de méthanol absolu puis

1,5ml d'eau. L'éluat (environ 3 ml) est alors évaporé à sec sous azote et repris dans 500  $\mu$ l de mélange eau-acétonitrile 1-1 avant d'être dérivatisé et injecté au système HPLC. Cette méthode est appelée méthode « IA ». Elle est présentée dans la figure n°7.



**Figure 7 : Description de la méthode d'extraction - purification « IA ».**

## 4.2 Détection et quantification.

La chromatographie liquide haute pression (HPLC) est la méthode de séparation de référence [44] et la fluorométrie est la méthode la plus utilisée pour la détection. Comme la fumonisine n'absorbe ni dans le visible ni dans l'ultra-violet, une étape de dérivation est nécessaire. L'O-phthaldialdéhyde est le réactif de choix, et bien qu'il soit instable (stabilité d'une semaine environ), c'est le réactif le plus utilisé dans les laboratoires [45].

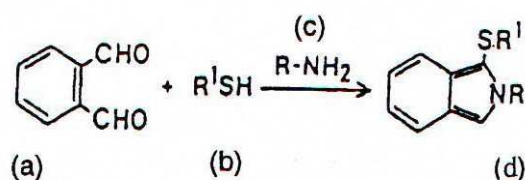


Figure 8 : Réaction de dérivation par l'OPA.

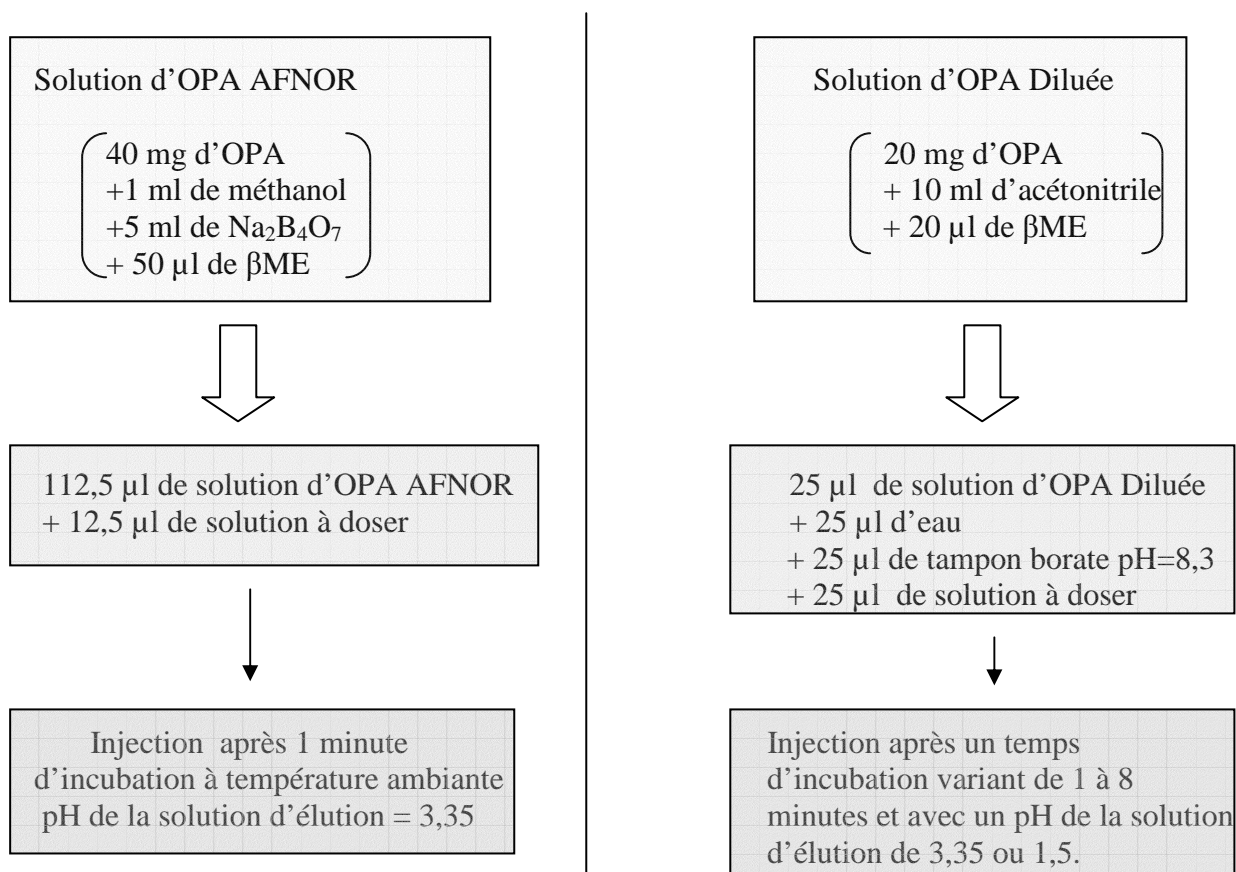
a: OPA, b: 2BME, c: FB1, d: dérivé fluorescent.

Nous avons utilisé plusieurs procédés de dérivation afin d'optimiser l'étape de détection en sélectionnant le meilleur d'entre eux pour le traitement de nos échantillons de plasma.

Les différentes méthodes de dérivation utilisées sont les suivantes :

La première méthode de dérivation utilisée est la méthode de dérivation correspondant aux recommandations AFNOR pour le dosage de fumonisine extraite à partir de matrice végétale (norme NF EN 13585). La solution d'OPA utilisée est appelée solution d'OPA AFNOR dont la composition est présentée dans le chapitre II.2. 12,5 µl d'échantillon à doser sont prélevés et mélangés à 112,5 µl de la solution d'OPA AFNOR. L'injection du mélange au système HPLC a lieu 60 secondes après. La phase mobile du système HPLC possède un pH de 3,35.





**Figure 9: Description des méthodes de dérivation utilisées.**

Les autres méthodes utilisent toutes la même solution d'OPA, la solution d'OPA *diluée* et une dilution avant injection légèrement différente de la méthode AFNOR : 25 µl de solution d'OPA sont mis en présence de 25 µl d'eau, de 25 µl de tampon borate de pH= 8,5 et de 25 µl de solution à doser.

Elles diffèrent par le temps d'incubation avant injection qui est respectivement de 1, 4 et 8 minutes.

Enfin une autre méthode utilise la même solution d'OPA que les précédentes, la même dilution et un temps d'incubation avant injection de une minute. Cependant, le pH du solvant d'élution du système HPLC est changé puisque il est de 1,5 dans cette méthode au lieu de 3,35 dans toutes les autres.

La durée d'incubation avant injection n'a pas été poursuivie plus longtemps que 8 minutes car il est décrit qu'une diminution de fluorescence de 5% à lieu à 8 minutes et que cette diminution s'accroît par la suite. Il est important de noter que quelle que soit leur composition, les solutions d'OPA ne sont conservées que 10 jours maximum à l'abri de la lumière et à 4°C, car elles sont instables [42].

### **III. RESULTATS ET DISCUSSION.**

#### **1. Optimisation de la méthode de dosage.**

##### **1.1. Optimisation de la dérivation.**

###### **1.1.1. Sélection de la meilleure méthode de dérivation.**

Plusieurs méthodes de dérivation ont été utilisées. L'objectif de cette étude comparative est de sélectionner la méthode la plus intéressante, en terme de limite de détection et de fidélité, afin de l'appliquer au traitement de nos échantillons.

Des solutions dépourvues de FB1 ont également subi ces protocoles de dérivation, afin de pouvoir quantifier les interférences inhérentes à chaque méthode. Ces solutions ont été dosées 5 fois pour chaque méthode de dérivation. La réponse du détecteur fluorométrique du système HPLC correspond à un pic de chromatographie dont l'aire s'exprime en  $\mu\text{v}^*\text{s}$ .

Des solutions de FB1 aux doses de 0,005  $\mu\text{g/ml}$ , 0,025  $\mu\text{g/ml}$ , et 0,25  $\mu\text{g/ml}$  ont été réalisées à partir de FB1 standard. Chacune de ces solutions n'ont été dosées qu'une seule fois pour chaque méthode de dérivation.

Les résultats des dosages de ces solutions sont présentés dans le tableau n°2.

| Méthode de dérivation       | OPA<br>Durée d'incubation<br>pH | AFNOR<br>1 min<br>3,35 | Dilué<br>1 min<br>3,35 | Dilué<br>4 min<br>3,35 | Dilué<br>8 min<br>3,35 | Dilué<br>1 min<br>1,5 |
|-----------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 0 µg/ml : moyenne           |                                 | 125124                 | 4838                   | 35447                  | 824099                 | 1275                  |
| 0 µg/ml : écart type        |                                 | 57406                  | 769                    | 19981                  | 348133                 | 650                   |
| 0 µg/ml : CV %              |                                 | <b>45,8</b>            | <b>15,8</b>            | <b>56,3</b>            | <b>42,2</b>            | <b>50,9</b>           |
| 0,005µg/ml                  |                                 | 274321                 | 33771                  | 78543                  | 576005                 | 3440                  |
| 0,025µg/ml                  |                                 | 439957                 | 204370                 | 413097                 | 931351                 | 87869                 |
| 0,25µg/ml                   |                                 | 2755904                | 2093901                | 3569303                | 4213938                | 1626809               |
| LD en surface (µv*s)        |                                 | 250248                 | 9676                   | 70894                  | 1648198                | 2550                  |
| Coefficient de corrélation  |                                 | 0.9991                 | 1                      | 0.9998                 | 0.9589                 | 0.998                 |
| LD en concentration (µg/ml) |                                 | <b>0,0068</b>          | <b>0,0012</b>          | <b>0,0029</b>          | <b>0,0837</b>          | <b>0,0051</b>         |

**Tableau 2 : Comparaison des différentes méthodes de dérivation.**

Les limites de détection (LD) ont été calculées selon la définition :

$LD = 2 \times \text{moyenne des interférences}$ .

Les limites de détection en unité de concentration ont été obtenues en utilisant la droite de régression calculée pour chaque méthode. Elles ne sont pas très fiables compte tenu du faible nombre de résultats obtenus en dosant les solutions contenant de la FB1, bien que les coefficients de corrélation des droites de régression soient très proches de 1 pour chacune des méthodes. Cette approche est toutefois suffisante pour permettre de différencier certains avantages et inconvénients de chaque méthode.

Ainsi la méthode nécessitant une incubation de 8 minutes peut être rejetée sur la base de sa mauvaise LD. La méthode avec une incubation de 4 minutes et celle utilisant un pH d'élution de 1,5, bien qu'elles semblent posséder de bonnes LD, présentent des coefficients de variation élevés.

La méthode utilisant les recommandations AFNOR pour le dosage de fumonisine extraite à partir de matrice végétale ne semble pas non plus utilisable compte tenu des trop importantes interférences détectées.

La méthode utilisant la solution d'OPA diluée, un temps d'incubation de 1 minute et un pH de la solution d'élution de 3,35, présente à la fois la LD et le coefficient de variation les plus faibles. C'est cette méthode qui sera retenue par la suite.

### 1.1.2. Validation de la méthode de dérivation.

Il est nécessaire d'évaluer la linéarité, les limites de détection et de quantification de la méthode analytique et la fidélité de la méthode de dérivation sélectionnée [46, 47].

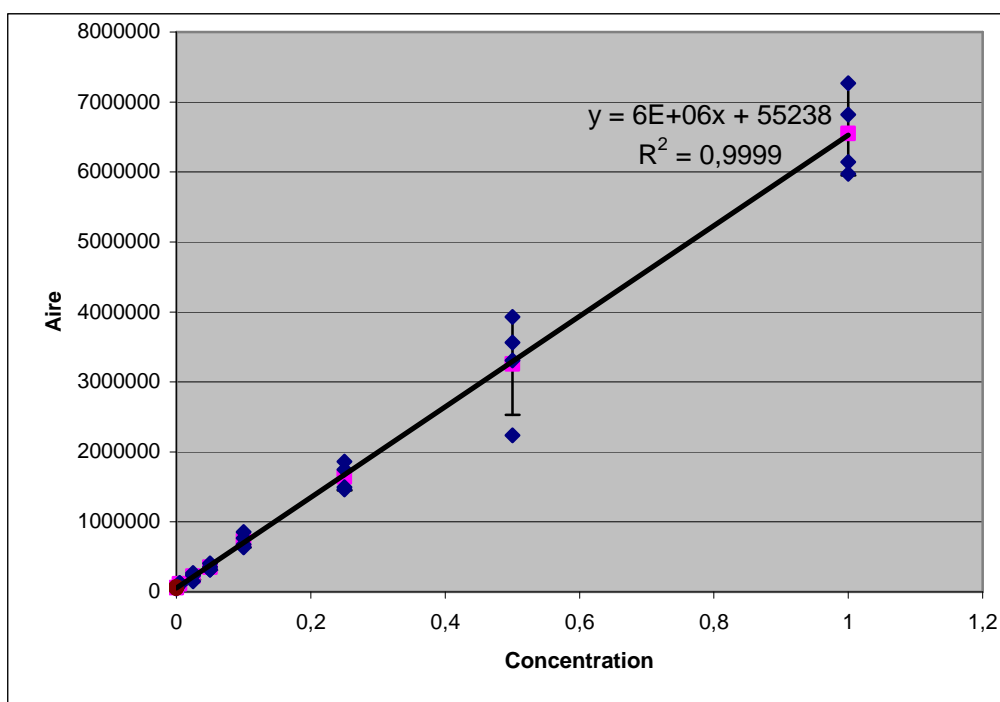
Pour cela, des solutions diluées de standard FB1 ont été utilisées pour réaliser une étude de régression. Ces solutions, dont les concentrations sont les suivantes : 0 µg/ml, 0,005 µg/ml, 0,025 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml et 1 µg/ml ont été injectées deux fois chacune dans le système HPLC, après dérivation.

Une nouvelle série de solutions aux mêmes concentrations a été réalisée une semaine plus tard et de nouveau injectée deux fois. Nous possédons donc 4 valeurs différentes pour une solution de même concentration. La moyenne de ces quatre valeurs est présentée dans le tableau n°3, de même que l'écart type de ces valeurs.

| Concentration<br>(µg/ml) | Aire (µv*s)<br>moyenne | Ecart type   | Facteur de<br>réponse |
|--------------------------|------------------------|--------------|-----------------------|
| 0                        | 57317                  | 6824         | 0                     |
| <b>0,005</b>             | <b>116529</b>          | <b>13695</b> | <b>23305800</b>       |
| 0,025                    | 204370                 | 50979        | 8174800               |
| 0,05                     | 350759                 | 41167        | 7015180               |
| 0,1                      | 733398                 | 98022        | 7333980               |
| 0,25                     | 1641870                | 193743       | 6567480               |
| 0,5                      | 3258898                | 727998       | 6517796               |
| 1                        | 6550682                | 601834       | 6550682               |
|                          |                        |              | Moy 7026653           |
|                          |                        |              | EType 649483          |
|                          |                        |              | <b>CV% 9,2</b>        |

**Tableau 3 : Etude de la linéarité de la méthode de dérivation sélectionnée**

La droite de régression obtenue est présentée dans la figure n°10.



**Figure 10: Représentation de la linéarité de la méthode de dérivation.**

La réponse du détecteur en fonction de la concentration semble linéaire sur une gamme de concentration comprise entre 0 et 1 µg/ml. Le coefficient de corrélation de cette droite est 0,9999 et le coefficient de variation du facteur de réponse est 9,2 %. La valeur du facteur de réponse correspondant à une concentration de 0,005 µg/ml est trop élevée et n'a pas été prise en compte lors du calcul de ce coefficient de variation. Il semble que cette valeur soit inférieure à la limite de détection de la méthode de dérivation.

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de la méthode sont calculées en fonction des valeurs des interférences.

$LD \text{ (en } \mu\text{V}\cdot\text{s)} = 2 \times \text{valeur moyenne des interférences}$ , soit  $LD \text{ (en } \mu\text{g/ml)} = \{LD(\text{en } \mu\text{V}\cdot\text{s}) - 55238\} / 6.10^6$

D'où  $LD = 114634 \mu\text{V}\cdot\text{s}$ , soit  **$LD = 0,0099 \mu\text{g/ml}$** , arrondie à  **$0,01 \mu\text{g/ml}$** .

et  $2 \times LD = LQ = 0,0198 \mu\text{g/ml}$ , arrondie à  **$0,02 \mu\text{g/ml}$** .

Répétabilité et reproductibilité de la méthode de dosage sont des éléments importants pour l'interprétation des résultats.

La répétabilité a été estimée en injectant cinq fois de suite la même solution de FB1, de concentration 0,5 µg/ml. Les résultats sont présentés dans le tableau 4. Le coefficient de variation obtenu est de 7,9 %. Bien que cette variation soit élevée, elle est considérée comme satisfaisante sur la base de l'expérience antérieure du laboratoire sur ce dosage.

| Concentration de la solution standard utilisée | Valeur obtenue |
|--|----------------|
| 0,5 µg/ml                                      | 3276294        |
| 0,5 µg/ml                                      | 3527500        |
| 0,5 µg/ml                                      | 3832335        |
| 0,5 µg/ml                                      | 3355927        |
| 0,5 µg/ml                                      | 3123300        |
| Moyenne  | 3423071        |
| Ecart type                                     | 271254         |
| CV%  | <b>7,9</b>     |

**Tableau 4 : Répétabilité de la méthode de dosage.**

La reproductibilité de la méthode a été estimée en injectant plusieurs jours de suite les mêmes solutions standard.

Une première solution (solution 1) de concentration 0,5 µg/ml a ainsi été injectée 3 jours de suite, puis une nouvelle solution (solution 2) de même concentration a été injectée à nouveau 4 jours de suite. De la même manière, une troisième solution (solution 3) de concentration 1 µg/ml a été injectée 4 jours de suite. Les résultats sont présentés dans le tableau n°5.

| Solution injectée | Concentration de la solution (µg/ml) | Date     | Aire obtenue | Moyennes | Ecart Type | CV%          |
|-------------------|--------------------------------------|----------|--------------|----------|------------|--------------|
| Solution 1        | 0,5                                  | 15/12/04 | 3276294      | 3384629  | 411143     | <b>12,14</b> |
| Solution 1        | 0,5                                  | 16/12/04 | 3839093      |          |            |              |
| Solution 1        | 0,5                                  | 17/12/04 | 3038502      |          |            |              |
| Solution 2        | 0,5                                  | 08/02/05 | 2647488      | 2960563  | 539606     | <b>18,22</b> |
| Solution 2        | 0,5                                  | 09/02/05 | 2588281      |          |            |              |
| Solution 2        | 0,5                                  | 10/02/05 | 3751605      |          |            |              |
| Solution 2        | 0,5                                  | 11/02/05 | 2854880      |          |            |              |
| Solution 3        | 1                                    | 18/01/05 | 7265974      | 6559348  | 723046     | <b>11,02</b> |
| Solution 3        | 1                                    | 19/01/05 | 6211372      |          |            |              |
| Solution 3        | 1                                    | 20/01/05 | 5715329      |          |            |              |
| Solution 3        | 1                                    | 21/01/05 | 7044720      |          |            |              |

**Tableau 5 : Reproductibilité de la méthode de dosage.**

Les coefficients de variation obtenus sont élevés, la reproductibilité de la méthode n'est pas jugée satisfaisante et il en sera tenu compte dans la méthodologie du traitement des échantillons de plasma de canards : en effet, une solution standard de FB1 de concentration standard sera injectée tous les jours où les dosages de ses plasmas seront effectués. Ainsi le biais provoqué par ce manque de reproductibilité de la méthode de dosage sera levé.

## **1.2. Optimisation de l'extraction – purification.**

L'optimisation des méthodes d'extraction et de purification avant dérivation consiste à déterminer la meilleure technique pour le traitement des plasmas. Différentes méthodes ont été comparées, en utilisant des sérums de canard maigre dépourvus de FB1 et d'autres sérums fortifiés en FB1 à 1 µg/ml à partir de solutions standard de FB1 10 µg/ml.

La méthode qui sera jugée la plus performante, c'est-à-dire celle qui possédera les meilleures sensibilité et spécificité, ainsi que la meilleure fidélité, sera ensuite utilisée pour le traitement des échantillons de plasma obtenus par administration orale de FB1 aux canards.

Une méthode est qualifiée de sensible lorsqu'elle fournit les réponses fluorométriques les plus élevées lors du traitement de sérums fortifiés en FB1.

Une méthode est qualifiée de spécifique quand elle fournit les réponses les plus basses lors d'utilisation de plasmas dépourvus de FB1.

La fidélité (répétabilité et reproductibilité) de la méthode d'extraction sera jugée grâce aux coefficients de variation des valeurs obtenues.

La technique d'extraction est le seul facteur de variation : la procédure de dérivation correspond à la méthode validée au préalable soit la méthode utilisant la solution d'OPA diluée et une durée d'incubation de 1 minute avant injection.

Trois lots de plasma de canards maigres sont utilisés. Bien que la nature des canards et la méthode de prélèvement de ces plasmas soient identiques, leur durée de conservation n'est pas identique. De plus, les deux lots de plasmas n°1 et n°3 utilisés étaient complétés en FB1 avant leur congélation, alors que le deuxième lot n'a été supplémenté qu'après décongélation et donc juste avant utilisation. Ainsi bien que les concentrations théoriques des plasmas supplémentés utilisés soit toutes de 1 µg/ml, la concentration effective de chaque lot de plasma peut varier d'un lot de plasma à l'autre, ce qui peut expliquer les variations des valeurs obtenues d'un lot de plasma à l'autre.

Toutes les méthodes sont comparées à une seule et même méthode, la méthode « Témoin » utilisée lors des études antérieures.



### 1.2.1. Résultats obtenus avec des plasmas non supplémentés.

Les résultats sont présentés dans le tableau n°6. Le terme rapport correspond au rapport entre la moyenne des valeurs obtenues par la méthode d'extraction étudiée et la moyenne des valeurs obtenues par la méthode « *Témoin* ».

| <b>Plasmas non supplémentés</b> | Minimum | Maximum | Moyenne | Ecart type | CV %  | Rapport     |
|---------------------------------|---------|---------|---------|------------|-------|-------------|
| <b>Lot n°1</b>                  |         |         |         |            |       |             |
| Témoin                          | 124115  | 178680  | 151397  | 38583      | 25,5  | <b>1</b>    |
| Dilution                        | 4762    | 8379    | 6570    | 2557       | 38,6  | <b>0,04</b> |
| Chloroforme neutre              | 167794  | 189556  | 178675  | 15388      | 8,6   | <b>1,18</b> |
| Chloroforme HCl                 | 0       | 7150    | 3575    | 5055       | 141,3 | <b>0,02</b> |
| Chloroforme NaOH                | 67300   | 67365   | 67332   | 2557       | 37,9  | <b>0,44</b> |
| <b>Lot n°2</b>                  |         |         |         |            |       |             |
| Témoin                          | 341263  | 457225  | 423120  | 55166      | 13,0  | <b>1</b>    |
| Dilution                        | 158121  | 206255  | 182188  | 33941      | 18,6  | <b>0,43</b> |
| Chloroforme HCl                 | 242899  | 256745  | 249822  | 9192       | 3,6   | <b>0,59</b> |
| Chloroforme TCA                 | 50567   | 146000  | 98300   | 67481      | 68,6  | <b>0,23</b> |
| Chloroforme acidification douce | 323314  | 349000  | 336157  | 18162      | 5,4   | <b>0,79</b> |
| Chloroforme NaOH                | 129565  | 330231  | 229898  | 141421     | 61,5  | <b>0,54</b> |
| Phase chloroformique            | 256633  | 335723  | 296178  | 55925      | 18,8  | <b>0,70</b> |
| SAX                             | 113595  | 125451  | 117500  | 6799       | 5,7   | <b>0,27</b> |

**Tableau 6 : Comparaison des méthodes d'extraction et de purification lors d'utilisation de plasmas non supplémentés.**

Toutes les méthodes permettent d'obtenir un pic interférant inférieur à celui de la méthode « *Témoin* ». Seule la méthode « *Chloroforme neutre* » est moins spécifique, elle est donc abandonnée.

Il reste maintenant à vérifier si ces méthodes n'entraînent pas une perte de fumonisine trop importante.

### 1.2.2. Résultats obtenus avec des plasmas supplémentés en FB1.

Les résultats sont présentés dans le tableau n°7.

| Plasmas supplémentés            | Minimum  | Maximum  | Moyenne  | Ecart type | CV %  | Rapport     |
|---------------------------------|----------|----------|----------|------------|-------|-------------|
| <b>Lot n°1</b>                  |          |          |          |            |       |             |
| Témoin                          | 1102000  | 1417000  | 1260000  | 222738     | 17,6  | <b>1</b>    |
| Dilution                        | 838815   | 906334   | 872575   | 47743      | 5,4   | <b>0,69</b> |
| Chloroforme HCl                 | 560000   | 670000   | 615000   | 77781      | 0,1   | <b>0,49</b> |
| <b>Lot n°2</b>                  |          |          |          |            |       |             |
| Témoin                          | 23209000 | 28262249 | 26066896 | 2282285    | 8,7   | <b>1</b>    |
| Dilution                        | 8005775  | 8904411  | 8455093  | 635431     | 7,5   | <b>0,32</b> |
| Chloroforme HCl                 | 13423128 | 15330452 | 14376790 | 1348681    | 9,3   | <b>0,55</b> |
| Chloroforme TCA                 | 203000   | 2311145  | 1257072  | 1490683    | 118,6 | <b>0,05</b> |
| Chloroforme acidification douce | 17221311 | 18120173 | 17670742 | 633391     | 3,6   | <b>0,67</b> |
| Chloroforme NaOH                | 26465000 | 29537000 | 28001000 | 2172232    | 7,7   | <b>1,07</b> |
| Phase chloroformique            | 12828325 | 19222381 | 16025353 | 4521280    | 28,2  | <b>0,61</b> |
| SAX                             | 25271641 | 30557857 | 27924989 | 2643167    | 9,4   | <b>1,07</b> |

**Tableau 7 : Comparaison des méthodes d'extraction et de purification lors d'utilisation de plasmas supplémentés en FB1.**

Beaucoup de méthodes diminuent largement la réponse obtenue par le système HPLC et ne peuvent être utilisées pour notre étude.

Les méthodes « *chloroforme NaOH* » et « *SAX* » semblent intéressantes pour notre étude car semblent présenter en comparaison à la méthode « témoin » à la fois une plus faible réponse lors de l'utilisation de plasma non supplémentés et une réponse plus forte lors de l'utilisation de plasma supplémentés.

Toutefois, la méthode « *chloroforme NaOH* » semble peu satisfaisante au niveau de sa reproductibilité. En effet, lors de l'utilisation de plasmas non supplémentés, le coefficient de variation des valeurs obtenues en utilisant cette méthode est de 0,61.

C'est pourquoi la méthode « *SAX* », c'est-à-dire la méthode d'extraction et de purification par passage sur colonnes échangeuses d'ions est retenue pour notre étude. Le troisième lot de plasmas est utilisé afin de confirmer l'intérêt de cette méthode par rapport à la méthode « *Témoin* ».

### 1.2.3. Comparaison des méthodes « *Témoin* » et « *SAX* ».

Le troisième lot de plasmas est utilisé comme précédemment, c'est-à-dire d'abord non supplémenté en FB1 puis supplémenté en FB1.

Les résultats obtenus lors d'utilisation de plasmas non supplémentés et supplémentés en FB1 sont présentés dans le tableau n°8.

| Lot n°3                  | Minimum | Maximum | Moyenne | Ecart type | CV% | Rap port |
|--------------------------|---------|---------|---------|------------|-----|----------|
| Plasmas non supplémentés |         |         |         |            |     |          |
| Témoin                   | 0       | 70000   | 27000   | 29475      | 107 | 1        |
| SAX                      | 92335   | 215000  | 135000  | 46727      | 32  | 5        |
| Plasmas supplémentés     |         |         |         |            |     |          |
| Témoin                   | 4700000 | 5860000 | 5400000 | 512708     | 9,6 | 1        |
| SAX                      | 7602079 | 9899780 | 8720000 | 829996     | 9,5 | 1,61     |

**Tableau 8 : Comparaison des méthodes « *Témoin* » et « *SAX* »**

Dans cet essai la méthode « *SAX* » semble plus sensible mais moins spécifique que la méthode « *Témoin* ». Toutefois, elle semble présenter une meilleure répétabilité (CV= 32 % contre 107%).

De plus elle présente également une meilleure reproductibilité : en effet les valeurs obtenues avec les lots de plasma n°2 et n°3 non supplémentés sont proches avec la méthode « *SAX* » ce qui n'est pas le cas avec la méthode « *Témoin* ». (cf tableau n°6).

Nous retenons donc la méthode d'extraction et de purification avec passage sur colonnes échangeuses d'ions pour le traitement des échantillons de l'étude. Il est important de noter que nous obtenons une assez forte variabilité du pic interférant au cours de nos essais sur plasma. Cet aspect sera ré-envisagé dans le paragraphe 2.2.1.

## **2. Traitement des échantillons.**

Les échantillons de plasmas de canards ont été purifiés selon la méthode « SAX » puis dérivatisés selon la méthode sélectionnée au préalable (solution d'OPA diluée et temps d'incubation de 1 minute).

Ces dosages ont nécessité plusieurs jours d'étude, aussi chaque jour, une ou plusieurs solutions standard de FB1 ont été injectées au système HPLC. Ceci a été jugé nécessaire compte tenu du défaut de reproductibilité préalablement constaté.

### **2.1. Calcul du coefficient d'extraction (CE).**

Afin de pouvoir fournir des résultats en concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ), le calcul du coefficient d'extraction de la méthode d'extraction et de purification par passage sur colonnes échangeuses d'ions est nécessaire.

Pour cela, des plasmas dépourvus de FB1 ont été supplémentés à l'aide de solution standard à des concentrations plasmatiques de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  et  $0,1 \mu\text{g/ml}$ . Ils ont été extraits, dérivatisés et injectés au système HPLC.

Des solutions standard de concentrations en FB1 de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  et de  $0,1 \mu\text{g/ml}$  ont également été préparées et injectées le même jour. Ces échantillons et solutions ont été préparés trois fois chacun. Les valeurs des réponses obtenues sur les chromatographes sont présentées sur le tableau n°9.

D'où un coefficient d'extraction moyen de **70 %**.

|                                     | Plasmas<br>0.1 µg/ml | Solutions<br>0.1µg/ml | Plasmas<br>0.5µg/ml | Solutions<br>0.5µg/ml |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| Echantillon 1                       | 540039               | 699543                | 1804493             | 3125738               |
| Echantillon 2                       | 667960               | 709882                | 2718021             | 3434525               |
| Echantillon 3                       | 492609               | 694499                | 1729577             | 3279428               |
| <b>Moyenne</b>                      | <b>566869</b>        | <b>701308</b>         | <b>2084030</b>      | <b>3279897</b>        |
| <b>Coefficient<br/>d'Extraction</b> | <b>80 %</b>          |                       | <b>63 %</b>         |                       |

Tableau 9 : Calcul du coefficient d'extraction de la méthode d'extraction par passage sur colonne échangeuse d'ions.

## 2.2. Variation des teneurs en fumonisine B1 dans le plasma suite à différentes administrations orales.

Deux méthodes différentes de calcul ont été effectuées afin de convertir les valeurs obtenues sur les chromatographes en concentration de FB1 dans le plasma d'origine.

La première méthode, appelée « *standard du jour* » tient compte de la faible reproductibilité de la méthode analytique. La valeur des réponses obtenues est corrigée en fonction des valeurs obtenues lors du dosage quotidien de solutions standard.

Nous obtenons donc la relation suivante :

**Concentration dans le plasma avant extraction (µg/ml) = [Surface (µv\*s) \* (1/0,7)]/ (surface du standard de concentration 1 µg/ml).**

La seconde méthode, appelée « *gamme* » ne tient pas compte de la non reproductibilité de la méthode analytique : les concentrations sont calculées en fonction de la droite de régression de la gamme obtenue sur les solutions de FB1 standard. Cette gamme standard nous a en effet permis d'obtenir la relation linéaire entre la concentration en FB1 de la solution injectée dans le système HPLC et la réponse du chromatographe :  $y=6.10^6x -55238$ .

La concentration doit tenir également compte du coefficient d'extraction.

Nous obtenons donc la relation suivante :

**Concentration dans le plasma avant extraction ( $\mu\text{g/ml}$ ) = [ $\{\text{Surface } (\mu\text{v} \cdot \text{s}) * (1/0,7)\} - 55238\] / 6.10^6$ .**

Les résultats obtenus avec la méthode « *standard du jour* » sont présentés dans le tableau n°10 et ceux obtenus avec la méthode « *gamme* » sont présentés dans le tableau n°11. Ils sont également représentés dans la figure n°11.

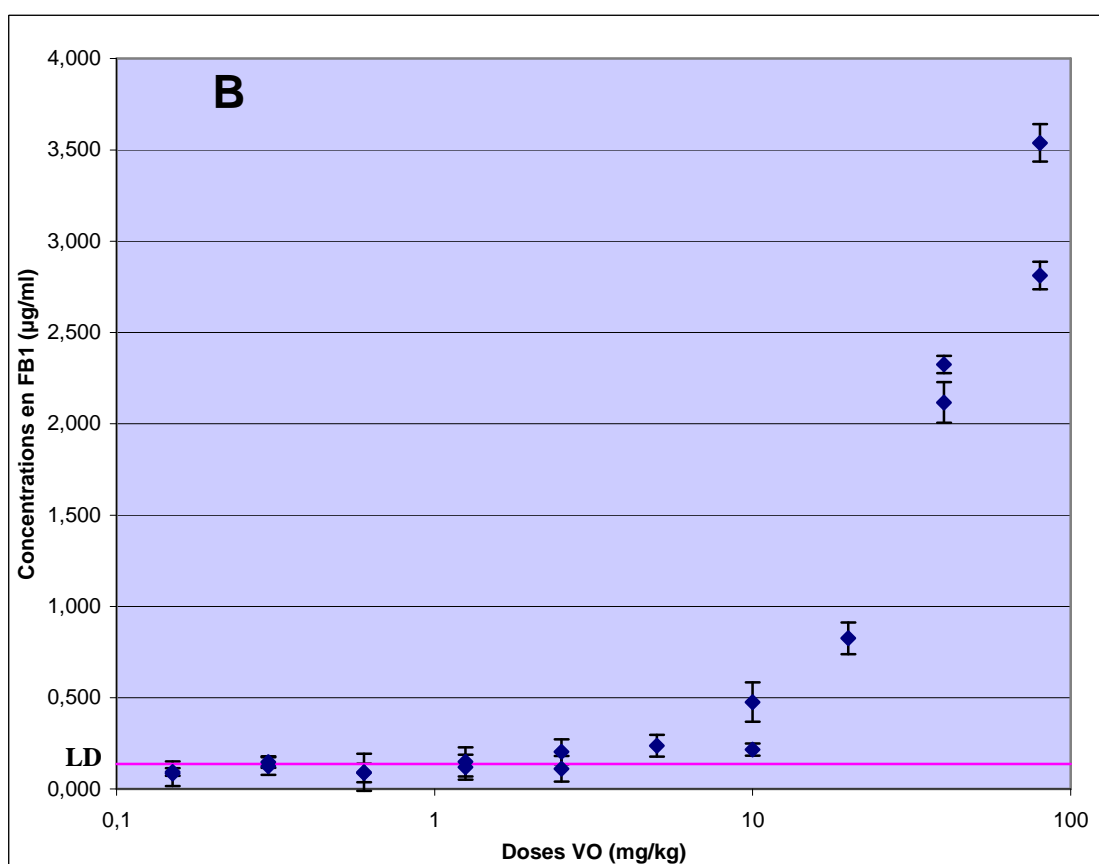
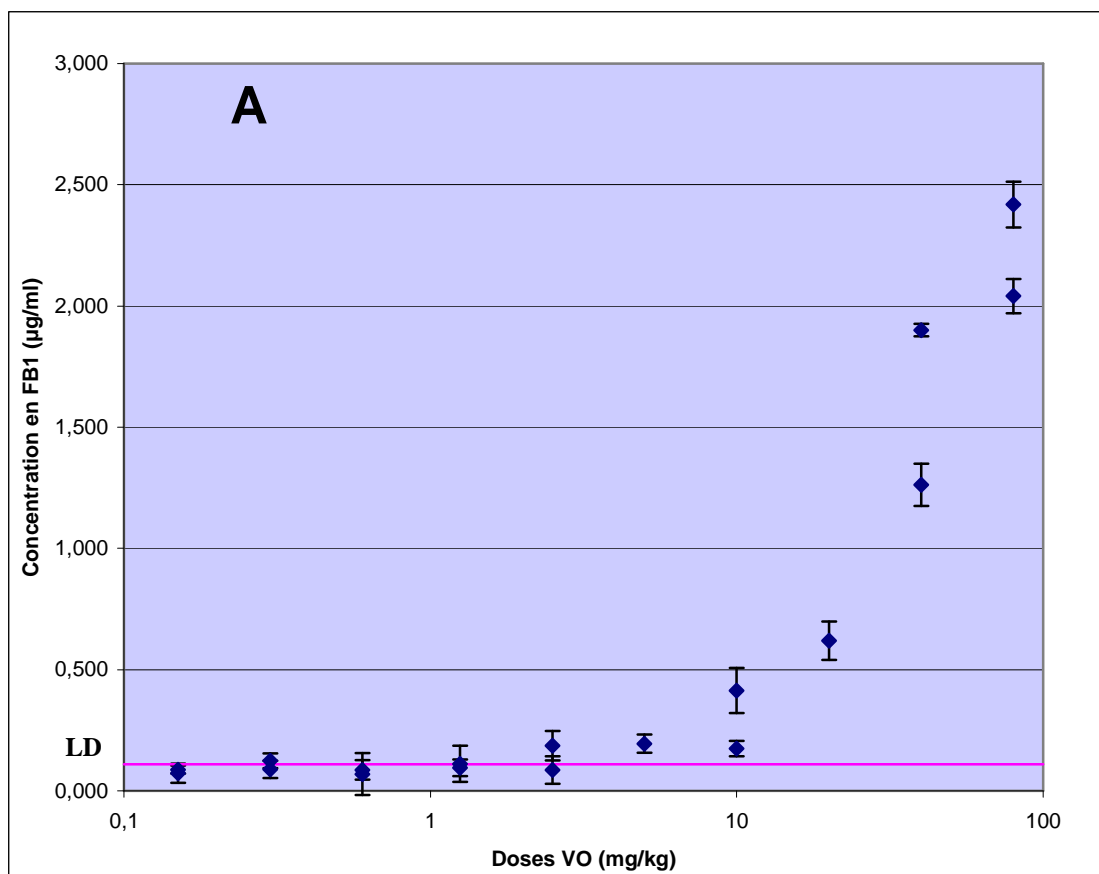
| N° du canard | Concentrations plasmatiques obtenues (en µg/ml) |       |       |       |        |       |       | Moyenne | Ecart type | CV          |
|--------------|---|-------|-------|-------|--------|-------|-------|---------|------------|-------------|
| 0-1          | 0,015   | 0,045 | 0,050 | 0,058 | 0,06   | 0,066 | 0,048 | 0,049   | 0,017      | <b>0,34</b> |
| 0-2          | 0,014   | 0,022 | 0,086 |       |        |       |       | 0,041   | 0,039      | <b>0,97</b> |
| 0-3          | 0,081   | 0,041 | 0,037 | 0,107 | 0,046  |       |       | 0,063   | 0,030      | <b>0,49</b> |
| 0-4          | 0,102   | 0,042 | 0,033 | 0,097 |        |       |       | 0,069   | 0,036      | <b>0,52</b> |
| 0-5          | 0,029   | 0,028 | 0,01  | 0,107 | 0,099  | 0,047 |       | 0,053   | 0,040      | <b>0,75</b> |
| 0.15-1       | 0,04  | 0,063 | 0,215 | 0,032 |        |       |       | 0,088   | 0,086      | <b>0,98</b> |
| 0.15-2       | 0,111   | 0,061 | 0,046 |       |        |       |       | 0,073   | 0,034      | <b>0,47</b> |
| 0.3-1        | 0,074   | 0,181 | 0,194 | 0,048 |        |       |       | 0,124   | 0,074      | <b>0,60</b> |
| 0.3-2        | 0,073   | 0,155 | 0,036 |       |        |       |       | 0,088   | 0,061      | <b>0,69</b> |
| 0.6-1        | 0,051   | 0,055 | 0,152 |       |        |       |       | 0,086   | 0,057      | <b>0,66</b> |
| 0.6-2        | 0,132   | 0,052 | 0,060 | 0,068 | 0,0329 |       |       | 0,069   | 0,038      | <b>0,54</b> |
| 1.25-1       | 0,075   | 0,149 | 0,089 | 0,070 | 0,091  |       |       | 0,095   | 0,032      | <b>0,33</b> |
| 1.25-2       | 0,049   | 0,066 | 0,219 |       |        |       |       | 0,111   | 0,094      | <b>0,84</b> |
| 2.5-1        | 0,282   | 0,143 | 0,127 | 0,261 | 0,115  |       |       | 0,186   | 0,079      | <b>0,43</b> |
| 2.5-2        | 0,12  | 0,074 | 0,089 | 0,060 |        |       |       | 0,086   | 0,026      | <b>0,30</b> |
| 5-1          | 0,189   | 0,286 | 0,115 | 0,101 | 0,278  |       |       | 0,194   | 0,087      | <b>0,45</b> |
| 5-2          | 0,025   | 0,179 |       |       |        |       |       |         |            |             |
| 10-1         | 0,144   | 0,257 | 0,110 | 0,240 | 0,117  |       |       | 0,174   | 0,070      | <b>0,40</b> |
| 10-2         | 0,218   | 0,28  | 0,346 | 0,485 | 0,297  | 0,441 | 0,290 | 0,413   | 0,095      | <b>0,23</b> |
| 20-1         | 1,105   | 0,551 |       |       |        |       |       |         |            |             |
| 20-2         | 0,369   | 0,675 | 0,814 |       |        |       |       | 0,619   | 0,228      | <b>0,37</b> |
| 40-1         | 1,640   | 1,624 | 2,713 | 1,628 |        |       |       | 1,901   | 0,541      | <b>0,28</b> |
| 40-2         | 2,247   | 1,532 | 0,559 | 0,712 |        |       |       | 1,263   | 0,783      | <b>0,62</b> |
| 80-1         | 2,455   | 1,353 | 2,316 |       |        |       |       | 2,041   | 0,600      | <b>0,29</b> |
| 80-2         | 1,570   | 2,938 | 2,749 |       |        |       |       | 2,419   | 0,741      | <b>0,30</b> |

**Tableau 10: Résultats du dosage des échantillons de plasma, obtenus par la méthode « standard du jour ».**

| N° du canard | Concentrations plasmatiques obtenues (en µg/ml) |       |        |        |       |       |       | Moyenne | Ecart type | CV          |
|--------------|---|-------|--------|--------|-------|-------|-------|---------|------------|-------------|
| 0-1          | 0,014   | 0,060 | 0,079  | 0,060  | 0,073 | 0,061 | 0,060 | 0,058   | 0,021      | <b>0,36</b> |
| 0-2          | 0,012   | 0,039 | 0,14   |        |       |       |       | 0,064   | 0,067      | <b>1,05</b> |
| 0-3          | 0,115   | 0,063 | 0,042  | 0,105  | 0,057 |       |       | 0,076   | 0,032      | <b>0,42</b> |
| 0-4          | 0,117   | 0,071 | 0,031  | 0,091  |       |       |       | 0,077   | 0,036      | <b>0,46</b> |
| 0-5          | 0,022   | 0,054 | 0,010  | 0,119  | 0,133 | 0,048 |       | 0,064   | 0,051      | <b>0,80</b> |
| 0.15-1       | 0,034   | 0,051 | 0,243  | 0,0415 |       |       |       | 0,092   | 0,101      | <b>1,09</b> |
| 0.15-2       | 0,161   | 0,054 | 0,035  |        |       |       |       | 0,083   | 0,068      | <b>0,82</b> |
| 0.3-1        | 0,111   | 0,207 | 0,218  | 0,052  |       |       |       | 0,147   | 0,080      | <b>0,54</b> |
| 0.3-2        | 0,153   | 0,173 | 0,0475 |        |       |       |       | 0,125   | 0,068      | <b>0,54</b> |
| 0.6-1        | 0,046   | 0,047 | 0,169  |        |       |       |       | 0,087   | 0,071      | <b>0,81</b> |
| 0.6-2        | 0,193   | 0,067 | 0,065  | 0,088  | 0,041 |       |       | 0,091   | 0,059      | <b>0,65</b> |
| 1.25-1       | 0,114   | 0,169 | 0,120  | 0,075  | 0,113 |       |       | 0,118   | 0,033      | <b>0,28</b> |
| 1.25-2       | 0,100   | 0,072 | 0,273  |        |       |       |       | 0,148   | 0,109      | <b>0,73</b> |
| 2.5-1        | 0,294   | 0,163 | 0,112  | 0,297  | 0,149 |       |       | 0,203   | 0,086      | <b>0,43</b> |
| 2.5-2        | 0,175   | 0,070 | 0,119  | 0,077  |       |       |       | 0,110   | 0,048      | <b>0,44</b> |
| 5-1          | 0,299   | 0,332 | 0,148  | 0,087  | 0,317 |       |       | 0,237   | 0,111      | <b>0,47</b> |
| 5-2          | 0,048   | 0,207 |        |        |       |       |       |         |            |             |
| 10-1         | 0,227   | 0,298 | 0,123  | 0,273  | 0,152 |       |       | 0,215   | 0,073      | <b>0,35</b> |
| 10-2         | 0,326   | 0,289 | 0,489  | 0,493  | 0,274 | 0,503 | 0,409 | 0,476   | 0,102      | <b>0,21</b> |
| 20-1         | 1,662   | 0,742 |        |        |       |       |       |         |            |             |
| 20-2         | 0,816   | 0,784 | 0,876  |        |       |       |       | 0,825   | 0,047      | <b>0,06</b> |
| 40-1         | 2,673   | 1,926 | 2,799  | 1,902  |       |       |       | 2,325   | 0,477      | <b>0,21</b> |
| 40-2         | 3,44  | 3,42  | 0,587  | 1,018  |       |       |       | 2,116   | 1,527      | <b>0,72</b> |
| 80-1         | 3,705   | 1,835 | 2,895  |        |       |       |       | 2,812   | 0,937      | <b>0,33</b> |
| 80-2         | 3,565   | 3,674 | 3,437  |        |       |       |       | 3,539   | 0,122      | <b>0,03</b> |

**Tableau 11 : Résultats du dosage des échantillons de plasma, obtenus par la méthode « gamme».**





**Figure 11 : Répartition des valeurs de concentration obtenues par les méthodes « *standard du jour* » (A) et « *gamme* » (B) (moyenne et écart-type)**

### 2.2.1. Limites de détection.

La valeur moyenne des interférences obtenue en utilisant la méthode « *gamme* » est 0,068 µg/ml. Elle est de 0,055 µg/ml en utilisant la méthode « *standard du jour* »

Les limites de détection correspondantes sont :

**LD =  $2 \times 0,068 = 0,136$  µg/ml** par la méthode « *gamme* »

**LD =  $2 \times 0,055 = 0,110$  µg/ml** par la méthode « *standard du jour* ».

Ces résultats sont du même ordre que les résultats fournis par Shephard et coll. en 1992. Une méthode de purification avec colonnes échangeuses d'ions, une dérivatisation avec de l'OPA et une détection avec un système HPLC phase inverse avait été utilisées. La limite de détection sur plasma obtenu était alors de 0,05 µg/ml [31].

Les valeurs de concentrations obtenues sont également en accord avec les résultats obtenus lors de précédentes études dans le laboratoire [34]. Une administration orale de 160 mg/kg de fumonisine B1 avait été effectuée pour 3 canards. Les concentrations plasmatiques obtenues étaient de l'ordre de 3 µg/ml 90 minutes après l'administration orale. Les plasmas avaient été purifiés selon la méthode « *Témoin* » et la méthode de détection prévoyait une injection du mélange dans le système HPLC après 10 minutes. Ces deux modifications méthodologiques suffisent à expliquer la plus faible valeur de concentration plasmatique en FB1 obtenue.

Il ressort de cette étude que, pour une analyse ponctuelle, la quantité minimale de FB1 administrée par voie orale détectable par cette méthode est fixée à **5 mg/kg**. En effet c'est à partir de cette dose administrée oralement que les valeurs de concentration plasmatique sont toutes supérieures à la LD, que ce soit avec la méthode « *standard du jour* » ou la méthode « *gamme* » .

### 2.2.2. Analyse statistique des résultats obtenus.

#### - ANOVA

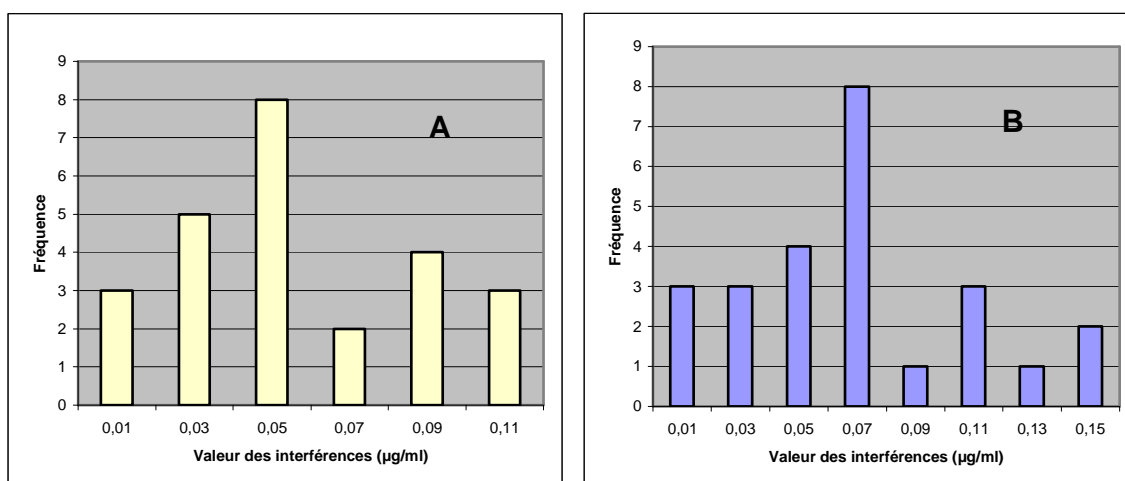
Une analyse de variance a été effectuée en fonction des doses administrées. Nous distinguons ainsi 11 populations différentes en fonction des doses de FB1 administrées. Par exemple, la population 0 regroupe les résultats obtenus par traitement des canards 0-1, 0-2, 0-3, 0-4 et 0-5 et la population 80 regroupe les résultats obtenus par traitement des canards 80-1 et 80-2. Chaque population de résultats est comparée à la population 0.

Cette analyse statistique révèle que, pour un  $p < 0,05$ , les populations 0,3; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 et 80 sont significativement différentes de la population 0 et ce quelle que soit la méthode de calcul.

Ainsi, lors d'analyses répétées d'échantillons et de comparaison à une population témoin non exposée, la quantité minimale de FB1 administrée par voie orale détectable par la méthode utilisée est fixée à **0,3 mg/kg**, soit une quantité plus de dix fois inférieure à la quantité détectable en cas d'analyse ponctuelle.

- Répartition du pic interférant.

La distribution des valeurs du pic interférant suit une loi normale, comme représenté sur la figure n°12.



**Figure 12 : Distribution des interférences lors du calcul par les méthodes "standard du jour" (A) et "gamme" (B)**

Les valeurs de quelques percentiles représentatifs de ces deux distributions sont présentées dans le tableau n° 12.

| méthode          | percentile 50 | percentile 75 | percentile 85 | percentile 95 |
|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| gamme            | 0,06          | 0,091         | 0,119         | 0,14          |
| standard du jour | 0,047         | 0,081         | 0,099         | 0,107         |

**Tableau 12 : Valeurs des percentiles des interférences.**

Le percentile 95 peut être utilisé pour détecter si des animaux sont exposés aux fumonisines. L'utilisation de ce percentile signifie que 5 % des dosages seront faussement déclarés positifs. En revanche, rapporté à la moyenne, aucun animal non exposé n'aurait été reconnu positif. Ceci est vrai pour la méthode « *gamme* » comme pour la méthode « *standard du jour* ».

Par cette approche, une exposition à la toxine pourrait être détectée dès la dose de **0,3 mg/kg** de poids vif. Ce niveau d'exposition correspond à celui observé comme significativement différent des témoins lors de l'utilisation de l'ANOVA.

### 2.3. Utilisation des colonnes d'immuno-affinité.

Seuls quelques échantillons ont pu être extraits et purifiés à l'aide de colonnes d'immuno-affinité.

Ainsi seuls les plasmas provenant des canards 0-1; 0-3; 0-4; 0-5; 2,5-1; 2,5-2; 5-1; 5-2; 40-1 et 40-2 ont été traités par ce procédé. De même le coefficient d'extraction de cette méthode n'a pas pu être mesuré, c'est pourquoi les résultats seront présentés en unité de surface ( $\mu\text{v}\cdot\text{s}$ ). Les résultats sont présentés dans la figure n°13 et le tableau n°13.

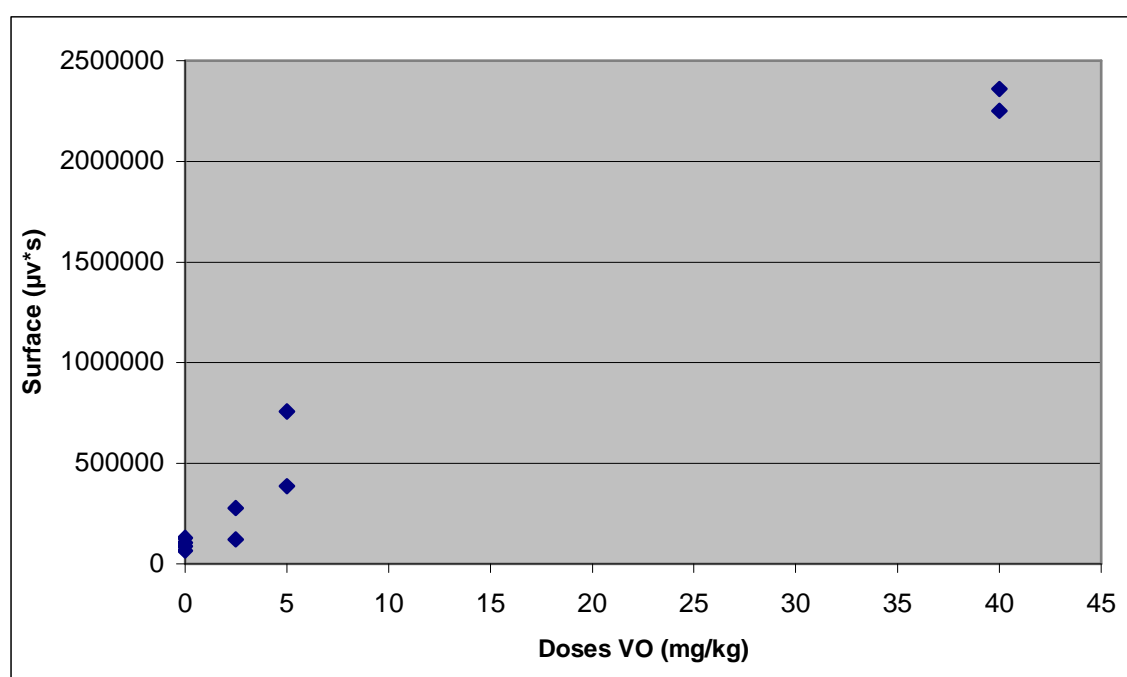


Figure 13 : Répartition des valeurs de surface obtenues par l'utilisation de colonnes d'immuno-affinité.

|     | dose VO | moyenne  | écart type | CV % |
|-----|---------|----------|------------|------|
| IA  | 0       | 194706   | 54808      | 28   |
|     | 2,5     | 401253   | 220355     | 55   |
|     | 5       | 1143200  | 521907     | 45   |
|     | 40      | 4610977  | 1510064    | 33   |
| SAX | 0       | 308262   | 215060     | 70   |
|     | 2,5     | 1058845  | 363880     | 34   |
|     | 5       | 794599   | 773923     | 97   |
|     | 40      | 13855674 | 1901288    | 13   |

**Tableau 13 : surfaces des chromatographes obtenues après purification de plasma par colonnes d'immuno-affinité et par colonnes échangeuses d'ions.**

L'analyse des résultats obtenus révèle que les colonnes d'immuno-affinité ne semblent pas plus intéressantes que les colonnes échangeuses d'ions dans le traitement des plasmas. Une des deux valeurs de surface obtenues lors du dosage des plasmas des canards ayant reçu 2,5 mg/kg ne semble pas différentes des valeurs des interférences. Ainsi la quantité minimale de FB1 administrée par voie orale détectable par cette méthode semble être également **5 mg/kg**. Les coefficients de variation obtenus par cette méthode ne sont pas meilleurs que lors de l'utilisation de colonnes échangeuses d'ions.

Toutefois, compte tenu du faible nombre d'expérimentations réalisées, nous ne pouvons nous prononcer sur l'utilité de cette méthode d'extraction et de purification.

## IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.

La première partie de notre étude nous a permis de constater qu'il n'est pas judicieux d'appliquer la méthode de dosage des fumonisines recommandée pour les matrices végétales sur des matrices carnées. Les colonnes échangeuse d'ions représentent bien un bon procédé d'extraction des fumonisines à partir du plasma mais il semble préférable d'utiliser un procédé de dérivation légèrement différent.

La méthode de dérivation utilisée permet de détecter des concentrations plasmatiques supérieures à 0,11 µg/ml. Cette limite de détection est élevée ; elle est liée à l'existence d'un pic interférant beaucoup plus important dans les plasmas que lors de l'analyse des solutions standard. Dans ces conditions des concentrations plasmatiques ne sont atteintes avec certitude que chez des animaux ayant reçus par voie orale d'importantes doses de FB1 (environ 5 mg/kg).

Cependant lors de dosages répétés et de comparaison à une population témoin n'ayant pas été exposée, l'analyse statistique des résultats obtenus permet de détecter la présence de fumonisine dès la dose de 0,3 mg/kg.

Cette analyse suggère que des améliorations peuvent être apportées à la méthode analytique utilisée. Elles passent par l'utilisation d'autres systèmes de purification (colonnes d'immunoaffinité, C18...) et/ou l'automatisation de la méthode de dérivation (par automate et passeur d'échantillons) comme c'est actuellement le cas dans de nombreux laboratoires pour le dosage de fumonisine dans les matrices végétales [27, 48].

## BIBLIOGRAPHIE

1. Agence Canadienne d'inspection des aliments. Section des aliments du bétail-CHARMLEY, L.L, TRENHOLM, H.L.  
(21/10/2003) Les mycotoxines, [en ligne].  
Adresse URL : <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/feebt/quelnew/mycof.shtml>
2. MARIN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A. J., MAGAN, N.  
Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology.  
*J. Food Prot.* 2004, **67**, 1792-1805.
3. MARIN, S., SANCHIS, V., MAGAN, N.  
Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize.  
*Can. J. Microbiol.*, 1995, **41**, 1063-1070.
4. LE BARS, J., LE BARS, P., DUPUY, J., BOUDA, H.  
Biotic and abiotic factors in Fumonisin B1 production and stability.  
*J. AOAC Int.*, 1994, **77**, 517-521.
5. BEZUIDENHOUT, S., GELDERBLOM, W.C., GORST-ALLMAN, C., MARASAS, W.F., SPITELLET, G., VLEGGAARD, R.  
Structure elucidation of the fumonisin, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*.  
*J. Chem. Soc. Commun.*, 1998, 743-745.
6. GELDERBLOM, W.C., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F., THIEL, P.G., HORAK, R.M., VLEGGAAR, R., KRIEK, N.P.  
Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **54**, 1806-1811.
7. DUPUY J.  
Principales mycotoxines produites par des souches de *Fusarium* isolées de cereales.  
Th. D. : Production animale et qualité des denrées., Toulouse I.N.P. : 1994, 229p.
8. SORIANO, J., DRAGACCI, S.  
Occurrence of fumonisins in food.  
*Food research Intern.*, 2004, **37**, 985-1000.
9. VISCONTI, A., MARASAS, W.F., MILLER, J.D., RILEY, R.  
(21/10/2003) Fumonisin, [en ligne] task3.  
Adresse URL : [http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/fusarium/items/5\\_taskgroupnews.htm](http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/fusarium/items/5_taskgroupnews.htm)



- 10. WANG, E., NORRED, W., BACON, C., RILEY, R.T., MERRILL, A.H.**  
Inhibition of sphingolipids biosynthesis by fumonisins; implications for disease associated with *Fusarium moniliforme*.  
*J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 1706-1716.
- 11. MERRILL, A., VAN-ECHEEN, G., WANG, E., SANDHOFF, K.**  
Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase *de novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*.  
*J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 27299-27306.
- 12. GONZALO, J.D., HERMAN, J.B.**  
Fumonisin toxicosis in domestic animals : a review.  
*Vet. Human Toxicol.*, 1994, **36**, 548-555.
- 13. ABBAS, H.K., DUKE, S.O., TANAKA, T.**  
Phytotoxicity of fumonisins and related compounds.  
*J. Toxicol. – Toxin reviews.*, 1993, **12**, 225-251.
- 14. HANNUN, Y., BELL, R.**  
Régulation of protein kinase C by sphingosine and lysosphingolipids.  
*Clin. Chim. Acta.*, 1989, **185**, 333-354.
- 15. CHEN, J., NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M., MERRILL, A., MORGAN, E.**  
Regulation of cytochrome P450 2C11 gene expression by interleukine-1, sphingomyelin hydrolysis, and ceramides in rat hepatocytes.  
*J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 25233-25238.
- 16. KIM, M-Y., LINARNIC, C., OBEID, L., HANNUN, Y.**  
Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor  $\alpha$  and gamma interferon.  
*J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 484-489.
- 17. GELDERBLOM, W.C., SNYMAN, S.D., ABEL, S., LEBEPE-MAZUR, S., SMUTS, C.M., VAN DER WESTHUIZEN, L., MARASAS, W.F., VICTOR, T.C., KNASMULLER, S., HUBER, W.**  
Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats. A chronically fed low dietary levels of fumonisin B1.  
*Toxicology*, 2001, **161**, 39-51.
- 18. JEFCA, IPCS INCHEM.**  
(21/10/2003), Fumonisin [en ligne].  
Adresse URL : <http://incchem.org/documents/jefca/jecmono/v47je03.htm>
- 19. THIBAULT, N.**  
Les fumonisines: nature, origine et toxicité.  
Th: Med.vet.: Toulouse: 1997.

- 20. HUSSEIN, S.H., BRASEL, J.M.**  
Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals.  
*Toxicology*, 2001, **167**, 101-134.
- 21. DUTTON, M.F.**  
Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effect.  
*Pharmacol. Ther.*, 1996, **70**, 137-161.
- 22. KRIEK, N.P., KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.**  
A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats.  
*Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1981, **48**, 129-31.
- 23. ESPADA, Y., RUIZ de GOPEGUI, R., CUADRADAS, C., CABANES, F.J.**  
Fumonisin mycotoxicosis in broilers: plasma proteins and coagulation modifications.  
*Avian Dis.*, 1997, **41**, 73-79.
- 24. HENRY, M.H., WYATT, R.D., FLETCHERT, O.J.**  
The toxicity of purified fumonisin B1 in broiler chicks.  
*Poultry science*, 2000, **79**, 1378-1384
- 25. BAILLY, J-D., BENARD, G., JOUGLAR, J-Y., DURAND, S., GUERRE, P.**  
Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducks.  
*Toxicology*, 2001, **163**, 11-22 .
- 26. WHO-IARC.**  
Toxins derived from *Fusarium moniliforme* Fumonisin B1 and B2 and fusarium C.  
Lyon (F): IARC. 1993.
- 27. ARRANZ, I., BAEYENS, W.R.G, VAN DER WEKEN, G., DE SAEGER, S., VAN PETEGHEM, C.**  
Review: HPLC determination of fumonisin mycotoxins.  
*Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, **44**, 195-203.
- 28. JEFCA**  
Fumonisin, 47<sup>th</sup> report of the joint expert committee on food additives,  
World Health Organization, Geneva, 2002.
- 29. SORIANO, J., DRAGACCI, S.**  
Intake, decontamination and legislation of fumonisin in foods.  
*Food research Intern.*, 2004, **37**, 367-374.
- 30. DE GIROLAMO, A., SOLFRIZZO, M., VON HOLST, C., VISCONTI, A.**  
Comparison of different extraction and clean-up procedures for the determination of fumonisins in maize and maize-based food products.  
*Food Add. Contam.*, 2001, **18**, 59-67.

- 31. SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., SYDENHAM, E. W.**  
Determination of fumonisin B1 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography.  
*J. Chromatogr.*, 1992, **574**, 299-304.
- 32. SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., SYDENHAM, V.R., ALBERTS, J.F.**  
Determination of the mycotoxin fumonisin B1 and the identification of its partially hydrolyzed metabolites in the faeces of the non-humans primates.  
*Food Chem. Toxicol.*, 1994, **32**, 23-31.
- 33. BAILLY, J.D., QUERIN, A., TARDIEU, D., GUERRE, P.**  
Production et purification des fumonisines issues d'une souche de *Fusarium verticilloides* fortement toxigène.  
*Rev .Med. Vet.*, 2005, **156**, 547-554.
- 34. BLUTEAU, C.**  
Toxicocinétique de la fumonisine B1 chez le canard.  
Th.: Med.vet. : Toulouse: 2005.
- 35. SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLOM, W.C.**  
Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.  
*J. liq. chromatogr.* 1990, **13**, 2077-2087.
- 36. ROTTINGHAUS, G.E., COATNEY, C.E., MINOR H.C.**  
A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B1 and B2.  
*J. Vet. Diagn. Invest.*, 1992, **4**, 326-329.
- 37. DUNCAN, K., KRUGER, S., ZAB, E N., KOHN, B., PRIOLI, R.**  
Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B1, B2, B3.  
*J. Chromatogr. A*, 1998, **815**, 41-47.
- 38. DEPOIRE, AG.**  
Détermination de la Fumonisine B1 chez le canard après exposition à de faibles doses.  
Th.: Med.vet. : Toulouse: 2005.
- 39. SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G.**  
Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in foods and feeds.  
*J. AOAC Int.*, 1992, **75**, 313-318.
- 40. SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W., STOCKENSTROM, S.**  
Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs.  
*J. Agric. Food Chem.* 1991, **39**, 2014-2018.

- 41. SYDENHAM, E.W., VAN DER WESTHUISEN, L., STOCKENSTROM, S.**  
Fumonisin-contaminated maize: physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments.  
*Food Addit. Contam.* 1994, **11**, 25-32.
- 42. TRUCKSESS, M., STACK, M., ALLEN, S., BARRION, N.**  
Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for the determination of FB1 in canned and frozen sweet corn.  
*J. AOAC Intern.*, 1995, **78**, 705-710.
- 43. WARE, G., UMRIGAR, P., CARMAN, A.Jr., KUAN, S.**  
Evaluation of fumonitoxin immunoaffinity columns.  
*Anal. Lett.*, 1994, **27**, 693-715.
- 44. SHEPHARD, G.S.**  
Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins  
*J Chromatogr. A*, 1998, **815**, 31-39.
- 45. SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., STOCKENSTROM, S., SYDENHAM, E.W.**  
Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based food products.  
*J. AOAC Int.* 1996, **79**, 671-677.
- 46. LECOMPTE, D.**  
Validation analytique d'une méthode de dosage par chromatographie liquide.  
*STP Pharma*, 1986, **2**, 843-849.
- 47. CAPORAL, J et al.**  
Validation analytique. Commentaires sur la note explicative européenne et exemple d'application. Rapport d'une commission SFSTP.  
*STP Pharma*, 1990, **6**, 588-594.
- 48. DILKIN, P., MALLMAN, C.A., DE ALMEIDA, C., CORREA, B.**  
Robotic automated clean-up for detection of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based feed by high-performance liquid chromatography.  
*J Chromatogr. A.*, 2001, **925**, 151-157.

Toulouse, 2006

**NOM** : MATHEZ

**PRENOM**: Lionel

**TITRE** : Perfectionnement de la méthode de détection de la Fumonisine B1 dans le plasma chez le canard.

**RESUME** :

La Fumonisine B1 est une mycotoxine potentiellement carcinogène pour l'homme. Le but de cet essai est de déterminer la plus petite quantité de FB1 détectable dans le plasma de canard après administration orale. 25 canetons mulards ont reçu par voie orale des doses de FB1 de 0 à 80 mg FB1 par kg de poids vif. Leur sang a été collecté 90 minutes après administration. La FB1 a été déterminée par HPLC et fluorométrie, après purification sur colonnes échangeuses d'ions. Cette méthode de purification a été sélectionnée parmi plusieurs méthodes. Les résultats obtenus révèlent une limite de détection de 0, 11 mg/l. Ces concentrations sont atteintes pour une administration orale de 5 mg/kg. Néanmoins, la comparaison statistique [ANOVA,  $p>0,05$ ] des animaux exposés aux témoins révèle une différence significative dès la dose de 0,3 mg/kg.

**MOTS-CLES** : Fumonisine B1 – résidus – HPLC – fluorométrie – canards – plasma –

---

**TITLE** : Improvement of the detection method of Fumonisin B1 in plasma in ducks.

**ABSTRACT** :

Fumonisin B1 is a mycotoxin potentially carcinogenic for humans. The aim of this study is to determine the smallest quantity of FB1 detectable in ducks plasma after oral administration. 25 ducklings were orally administrated solutions of 0 to 80 mg FB1 per kg of body weight. Blood samples were collected 90 minutes after administration. FB1 was determined by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and after SAX purification. This purification method was selected among several methods. Our results indicate that the detection limit in plasma is 0, 11 mg/l. These concentrations of FB1 were reached with a 5 mg/kg oral administration. Nevertheless, statistical comparison (ANOVA,  $p>0,05$ ) of exposed and control animals gives a significant difference by using a 0,3 mg/kg exposure.

**KEY-WORDS**: Fumonisin B1 – Residues – HPLC – Fluorimetry – duck – plasma –



